

**BIODISPONIBILIDAD DE VITAMINAS A Y E A
PARTIR DE LECHE ENTERA Y ENRIQUECIDA EN
SUJETOS CONTROL**

Dña. CARMEN HERRERO BARBUDO

*“The great value of foods is how they integrate
all of their benefits to enrich quality of life”.*

(German & Dillard, 2006)

*(El gran valor de los alimentos reside en cómo
integran sus beneficios para enriquecer nuestra
calidad de vida).*

**BIODISPONIBILIDAD DE VITAMINAS A Y E A PARTIR DE LECHE
ENTERA Y ENRIQUECIDA EN SUJETOS CONTROL**

Memoria para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas presentada por Dña.
M^a del Carmen Herrero Barbudo realizada en la Unidad de Vitaminas del Hospital
Universitario Puerta de Hierro.

**BIODISPONIBILIDAD DE VITAMINAS A Y E A PARTIR DE LECHE
ENTERA Y ENRIQUECIDA EN SUJETOS CONTROL**

M^a del Carmen Herrero Barbudo.

V^o B^o Directores de la Tesis

Dra. Begoña Olmedilla Alonso

Dr. Fernando Granado Lorencio



Madrid, 12 de junio de 2007

Dr. Fernando Granado Lorencio y la Dra Begoña Olmedilla Alonso han dirigido la Tesis titulada **“Biodisponibilidad de vitaminas A y E a partir de leche entera y enriquecida en sujetos control”** que para optar al título de Doctor presenta Dña. M^a del Carmen Herrero Barbudo y certifican que han leído la versión final, están de acuerdo con el contenido de la misma y autorizan su presentación en el Departamento de Química Física Aplicada.

Dr. Fernando Granado Lorencio

Dra. Begoña Olmedilla Alonso

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a la Dra. Begoña Olmedilla Alonso y al Dr. Fernando Granado Lorencio por su confianza, entusiasmo y apoyo en la dirección del presente estudio. Al Dr. Javier Tabera Galván por la tutoría del trabajo que aquí se presenta y por su colaboración en los trámites para su presentación.

A Pilar Martínez Montero y Teresa Motilla Valeriano, enfermeras del Servicio de Nutrición por su colaboración en la extracción de muestras de los ensayos. A Carmen Izquierdo y Elena Carbonell, personal administrativo por el trato a los voluntarios.

A Belén Pérez Sacristán, por el ánimo transmitido a la autora y sobre todo por el trabajo desempeñado en el laboratorio durante el periodo de escritura de esta Tesis. A Inmaculada Blanco por su ejemplo en el trabajo diario y su colaboración en el cuidadoso análisis de los datos.

A Paloma Pozo Barrero y Cristina Escudero del Servicio de Biblioteca por su inestimable ayuda en la búsqueda de material bibliográfico.

A Isabel Millán y Begoña Ayuso por su colaboración en el análisis estadístico de los resultados del presente estudio.

Al Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario Puerta de Hierro por la realización de los análisis bioquímicos en el estudio de intervención y por su apoyo a la investigación, así como a la Dirección del Hospital por facilitar la investigación en el centro.

A todos los voluntarios, por su participación y el entusiasmo mostrado en el ensayo de biodisponibilidad del presente trabajo.

Agradezco al Fondo de Investigaciones Sanitarias (Proyecto FIS 98/0386), por la financiación del proyecto que ha dado lugar a esta Tesis Doctoral. Al Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto CICYT AGL2001-2398-C03-02 y AGL2004-07657-C02-02) a la Red Temática de Investigación Cooperativa (Proyecto RCMN C03/08 y PI 051610), a la Universidad de Almería (Expte. BIO 2004-05834-C02-01), por la financiación de los proyectos en los que he participado activamente mientras realizaba esta tesis.

Agradezco a la Fundación para la Investigación Biomédica para el Hospital Universitario Puerta de Hierro, por su labor de gestión.

Al personal de diferentes organismos (Federación Española de Industrias Lácteas, Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas; Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) por su colaboración con el aporte de documentación bibliográfica.

A mi familia, por su carácter emprendedor, por mostrar ilusión y entusiasmo ante este proyecto. Ellos han sido los pilares de un modelo de vida en el que el esfuerzo y el trabajo priman para la consecución de grandes objetivos. A Ernesto y Rocío por la confianza y apoyo mantenidos en el tiempo, mi mayor agradecimiento.

1. INTRODUCCIÓN	17
1.1 Vitaminas A, E y carotenoides	18
1.1.1. Fuentes dietéticas	20
1.1.2. Determinación de vitaminas en el alimento	20
1.1.3. Factores que pueden afectar al contenido de vitaminas en el alimento	22
1.1.4. Metabolismo (absorción, transporte, almacenamiento y excreción) y estatus nutricional	22
1.1.4.1. Metabolismo de la vitamina A y los carotenoides	22
1.1.4.2. Metabolismo de la vitamina E	25
1.1.4.3. Estatus nutricional de vitamina A y E	27
1.1.5. Ingestas diarias recomendadas de vitaminas A y E	30
1.2. Leche entera y enriquecidas	32
1.2.1. Definiciones	32
1.2.2. Composición	33
1.2.2.1. Contenido en vitaminas A, E y carotenoides	35
1.2.3. Valor nutricional y factores que afectan a la digestibilidad de la leche	36
1.2.4. Alimentos enriquecidos y alimentos funcionales	37
1.2.5. Consumo de leche y productos lácteos en España	39
1.3. Biodisponibilidad	40
1.3.1. Definición	40

1.3.2. Metodología: Estudios de biodisponibilidad.....	41
1.3.3. Factores que afecta a la biodisponibilidad	44
1.3.3.1. Asociados al alimento.....	44
1.3.3.2. Asociados al sujeto	48
 2. OBJETIVOS	51
 3. MATERIAL Y SUJETOS	53
 3.1. Equipo cromatográfico	53
 3.2. Aparataje y material de laboratorio	53
 3.3. Reactivos y patrones.....	54
 3.4. Leche	54
 3.5. Sujetos.....	55
 4. METODOLOGÍA.....	58

4.1. Método cromatográfico	58
4.1.1. Detección e identificación.....	58
4.1.2. Curvas de calibrado y cuantificación	59
 4.2. Análisis de vitaminas A, E y carotenoides en leche entera y enriquecidas con vitaminas.	 60
4.2.1. Determinación de formas químicas individualizadas	60
4.2.2. Determinación del contenido total	61
 4.3. Análisis de vitaminas A, E y carotenoides en suero y en la fracción de lipoproteínas rica en triglicéridos (TRL).....	 62
4.3.1. Aislamiento de TRL	63
4.3.2. Extracción de vitaminas A, E y carotenoides en suero y en TRL.....	63
 4.4. Estudio de biodisponibilidad	 64
 4.5. Cálculo de la absorción relativa de vitaminas A, E y carotenoides durante el periodo postprandial	 66
4.5.1. Concentración de ésteres de retinilo totales y α -tocoferol a lo largo del tiempo. Área bajo la curva (AUC).....	66
4.5.2. Porcentaje de absorción relativa frente a la cantidad ingerida.....	66
 4.6. Control de calidad	 67

4.6.1. Determinaciones en leche	67
4.6.2. Determinaciones en suero	68
4.7. Análisis estadístico	68
 5. RESULTADOS	 77
 5.1. Análisis de vitaminas A, E y carotenoides en leche (entera, semidesnatada, y desnatada) enriquecida en vitaminas A y E	 77
5.1.1. Formas químicas individualizadas de vitaminas A y E	77
5.1.2. Contenido total de vitaminas A, E y carotenoides	78
5.1.2.1. Variabilidad entre envases del mismo lote	78
5.1.2.2. Variabilidad entre lotes de la misma marca.....	79
5.1.3. Control de calidad	79
 5.2. Estudio de biodisponibilidad en sujetos control	 80
5.2.1. Características basales de los sujetos en los ensayos	80
5.2.2. Formas químicas presentes y cantidad de vitaminas A, E y β -caroteno ingeridas con los tres tipos de leche empleados en el estudio de biodisponibilidad	80
5.2.3. Absorción relativa de las vitaminas a partir de los tres tipos de leche.....	81
5.2.3.1. Vitamina A	

5.2.3.1.1. Respuesta en la fracción de lipoproteínas ricas en triglicéridos.....	81
5.2.3.1.2. Respuesta en suero	83
5.2.3.2. Vitamina E	
5.2.3.2.1. Respuesta en la fracción de lipoproteínas ricas en triglicéridos.....	85
5.2.3.2.2. Respuesta en suero	85
5.2.3.3. Control de calidad de las determinaciones de vitaminas A y E en suero y en TRL.....	86
5.2.4. Comparación cualitativa (formas químicas de vitaminas A y E presentes) y cuantitativa (Cmax, AUCs, porcentajes de absorción) de la respuesta obtenida en suero y en TRL	86
5.2.5. Valoración de los diferentes métodos de cálculo de porcentaje de absorción de vitamina A.....	87
6. DISCUSIÓN	109
46.1. Análisis de vitaminas A, E y carotenoides en leche (entera, semidesnatada, y desnatada) enriquecida en vitaminas A y E.	109
6.1.1. Control de calidad	110
6.1.2. Formas químicas presentes y contenido total	110
6.1.2.1. Adecuación a la legislación	112

6.1.2.2. Variabilidad en el contenido de vitaminas A y E	113
6.2. Estudio de biodisponibilidad en sujetos control	115
6.2.1. Metodología para el estudio de biodisponibilidad	115
6.2.2. Respuestas obtenidas en TRL y suero.....	118
6.2.3. Absorción relativa de las vitaminas	123
6.2.3.1. Factores condicionantes de la absorción asociados al alimento	124
6.2.3.2. Factores condicionantes de la absorción asociados al sujeto.....	128
6.3. Valoración de los diferentes métodos de cálculo de porcentajes de absorción de vitamina A durante el periodo posptandial.....	129
6.4. Relevancia nutricional y aplicabilidad	130
7. CONCLUSIONES	134
8. BIBLIOGRAFÍA	136
9. ANEXOS	164
10. TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS	178

Lista de abreviaturas utilizadas

A.O.A.C: Association of Official Analytical Chemists.

ARAT: Acil Coenzima A retinol acil transferasa.

AUC: Área de la curva de concentraciones frente al tiempo.

BD: Biodisponibilidad.

BHT: Butil Hidroxi Tolueno.

CDR: Cantidad diaria recomendada.

CV: Coeficiente de variación.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EDTA: Ácido etilen diamino tetraacético.

FAO: Food and Agriculture Organization.

HDL: High Density Lipoprotein, (Lipoprotína de alta densidad).

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.

HUPT: Hospital Universitario Puerta de Hierro.

IMC: Índice de Masa Corporal.

INE: Instituto Nacional de Estadística.

IOM: Institute of Medicine.

LRAT: Lecitin retinol acil transferasa.

LDL: Low Density Lipoprotein (lipoproteínas de baja densidad).

MAPA: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

MRDR: Test de respuesta a dosis relativa (modificado).

NIST: National Institute of Standards and Technology .

OMS: Organización Mundial de la Salud.

RBP: Retinol Binding protein, (proteína transportadora de retinol).

RDR: Test de respuesta a dosis relativa.

TRL: Fracción de Lipoproteínas ricas en triglicéridos.

α -TTTP: α -tocoferol transfer protein (proteína transportadora de α -tocoferol).

UHT: Ultra high temperature.

UI: Unidades internacionales.

VLDL: Very Low Density Lipoprotein (lipoproteína de muy baja densidad).

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

El término “vitamina” fue introducido por Casimir Funk en 1912, un neologismo que proviene de los términos latinos “vita” (vida) y “amina” (sustancia derivada del amoníaco). Su descubrimiento y síntesis como constituyentes esenciales posibilitó la práctica erradicación de las enfermedades carenciales (ej. escorbuto por deficiencia de vitamina C; xeroftalmía por déficit de vitamina A) particularmente en los países desarrollados. Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la salud es un estado de completo bienestar físico, mental y social y no sólo la ausencia de enfermedad o dolencia (OMS, 1946), y por ello, durante las últimas décadas, las vitaminas se está, estudiando no sólo por su implicación en estados carenciales, sino también por su posible relación con estados óptimos de salud a través de su asociación con un menor riesgo de padecer diversas enfermedades crónicas.

La investigación en vitaminas y en compuestos relacionados se ha dirigido a conocer más y mejor estos compuestos determinando su participación en rutas metabólicas, expresión génica, procesos de diferenciación celular e interacción con otros nutrientes, entre otros aspectos. Asimismo, en el campo de la alimentación, existen líneas de trabajo para desarrollar procesos industriales que consigan una mejora en la preparación de alimentos, minimizar posibles pérdidas de estos nutrientes y aumentar la vida útil del producto.

1.1 .Vitaminas A, E y carotenoides.

Las vitaminas y carotenoides son micronutrientes y, por tanto, se encuentran en pequeñas cantidades en la dieta, pero son esenciales para el funcionamiento normal del organismo humano, porque intervienen en procesos tan importantes como la diferenciación celular, osificación, coagulación, crecimiento, visión, etc. Dado que el organismo no puede sintetizarlas, y cuando lo hace es en cantidades insuficientes, debemos incorporarlas a través de la dieta.

La **vitamina A** es un término genérico para los compuestos derivados de la β -ionona que poseen actividad biológica de all-trans-retinol o que están estructuralmente relacionados (Nomenclature Policy, 1987). El término incluye el all-trans-retinol (vitamina A preformada), sus análogos sintéticos y ciertos carotenoides que se pueden convertir en retinol en el organismo. El término retinoides es más amplio y hace referencia tanto a los compuestos naturales como a los análogos sintéticos (con o sin actividad de vitamina A).

Los **carotenoides** son pigmentos liposolubles, hidrocarburos tetraterpénicos derivados del isopreno (2-metil, 1,3 butadieno). En la naturaleza están descritos más de 600 y de estos sólo algunos tienen actividad provitamínica A en humanos (α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina). Generalmente contienen 40 átomos de carbono y tienen un sistema de dobles enlaces conjugados, dividiéndose en dos grupos, los carotenos, carotenoides hidrocarbonados, y las xantofilas, oxicarotenoides con al menos un átomo de oxígeno en su molécula. En la dieta se encuentran disponibles entre 40 y 50 carotenoides, que pueden ser absorbidos, metabolizados y utilizados por el organismo, aunque en suero no se han identificado más de treinta (Khachick y cols, 1991).

La vitamina A es importante para una función visual normal, la expresión génica, la diferenciación celular, la morfogénesis, el crecimiento y la función inmune (Blomhoff, 1994; IOM, 2001). En las actividades biológicas de los carotenoides, destacan la función provitamínica A, la acción antioxidante/pro-oxidante, la potenciación del sistema inmune, la inhibición de la mutagénesis, la actividad anticarcinogénica (*in vitro* e *in vivo*), la potenciación de la comunicación intercelular, la actividad fotoprotectora, así como su papel en la prevención de enfermedad cardiovascular, de la degeneración macular y la disminución del riesgo de formación de cataratas (Bendich y cols, 1989).

El término **vitamina E** agrupa derivados del tocol y tocotrienol que cualitativamente presentan actividad biológica de alfa-tocoferol. El término “tocoferoles” es la descripción genérica para todos los mono- di- y trimetil tocoles y tocotrienoles, y no es sinónimo del término vitamina E. Los ocho tocoferoles que se pueden aislar de fuentes vegetales, tienen un anillo 6-cromanol y una cadena lateral fitilo (con ocho, diez, trece, catorce átomos de carbono). Hay cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles que se presentan en la naturaleza y difieren en el número y posición de los grupos metilo en el anillo fenólico. Además de los isómeros que se presentan de forma natural, hay varios tipos de vitamina E sintética, fundamentalmente formas éster (ej. acetato de α -tocoferilo y succinato de α -tocoferilo) que están disponibles comercialmente. Estas formas ésteres son menos susceptibles a la oxidación y por tanto son más adecuadas para su utilización en la preparaciones farmacéuticas y por la industria alimentaria (Chow, 2001). Sólo el RRR- α -tocoferol (en forma libre o como ésteres) contribuye de forma significativa a la actividad vitamínica E en humanos. La función principal de la vitamina E está relacionada con mecanismos de antioxidación (protección de membranas) al prevenir la peroxidación lipídica (IOM, 2000).

1.1.1. Fuentes dietéticas.

La vitamina A puede ser ingerida en la dieta a partir de fuentes de origen animal como *vitamina A preformada* (retinol, retinal, ácido retinoico y ésteres de retinilo) en huevos, vísceras, pescados y productos lácteos, así como también a partir de carotenoides *provitamínicos A* procedentes de vegetales (IOM, 2001; Olson, 2001). Los carotenoides se encuentran presentes en los alimentos fundamentalmente como isómeros *all-trans* pero una proporción de isómeros *cis* pueden ser producidos durante el procesado de estos. En nuestro país, los carotenoides son aportados por un número reducido de frutas y hortalizas (Granado y cols, 1996). Respecto a la vitamina E, las fuentes naturales incluyen tanto productos de origen animal (ej. mantequilla, huevos, carne y pescados) como de origen vegetal (ej. germen de trigo, girasol, palma, oliva, y frutos secos) (Machin, 1984; IOM, 2001).

La leche constituye una buena fuente de vitamina A preformada, aunque no tan buena de vitamina E (IOM, 2001). No obstante, la disponibilidad de productos lácteos enriquecidos hace que estos puedan convertirse en una mejor fuente de algunos nutrientes (vitamina A y vitamina E) respecto a los productos sin modificar, sobre todo para determinados grupos de población (ej. personas mayores, niños) o en determinadas situaciones patológicas (ej. Alteraciones en la absorción) (Keane y cols, 1998; Barr y cols, 2000; Herrero y cols, 2002).

1.1.2. Determinación de vitaminas en alimentos.

Para la determinación de vitaminas en alimentos se necesitan métodos sensibles debido a la baja concentración en la que se encuentran estos compuestos en algunos

alimentos. Por otra parte estos analitos están inmersos en complejas matrices orgánicas, lo cual implica la utilización de adecuados procesos de extracción (Finglas y cols, 1996). Entre los métodos empleados en la determinación de vitaminas en alimentos, se encuentran métodos químicos, físicos y biológicos.

Los *métodos químicos* están basados en reacciones específicas de coloración o precipitación, aunque generalmente no son lo suficientemente específicos, pudiendo resultar positivos para sustancias de estructura química similar pero sin actividad vitamínica. Los *métodos físicos* se basan en la medición directa de una propiedad óptica de la solución problema. Los *métodos fisico-químicos* se fundamentan en la medición de una propiedad física de la solución problema que se desarrolla previo tratamiento con reactivos químicos específicos (métodos de extracción). Los *métodos biológicos* consisten en medir la acción fisiológica de la vitamina en animales de experimentación. Los *métodos microbiológicos* utilizan microorganismos que no pueden sintetizar una vitamina para la que presentan una necesidad absoluta para su crecimiento, el cual será proporcional dentro de ciertos límites, a la cantidad de vitamina que se introduzca en su medio de cultivo. Actualmente, el método de elección para la gran mayoría de las vitaminas, es la cromatografía líquida de alta eficacia por su sensibilidad, reproducibilidad, precisión y especificidad (Márquez y cols, 2002).

El amplio rango de concentraciones de vitaminas y carotenoides descritas en alimentos probablemente refleje tanto la variabilidad debida a factores asociados al alimento como a incertidumbres metodológicas. Es recomendable que los procedimientos analíticos estén validados, como es el caso de los métodos oficiales de análisis (AOAC Official Methods of Analysis, 2000). En general, la validación de métodos se suele realizar mediante programas de control de calidad o la utilización de materiales de referencia que permiten evaluar la

calidad de los métodos analíticos (precisión y exactitud) y por tanto proporcionan información sobre la fiabilidad que pueden tener los resultados.

1.1.3. Factores que pueden afectar al contenido de vitaminas en el alimento.

Son muchos los factores que pueden afectar al contenido de las vitaminas en el alimento, bien sean derivados de procesos de almacenaje (p.e. condiciones de luz, temperatura, oxígeno) o bien derivados de los procesos tecnológicos empleados en la elaboración del alimento, (p.e. tratamientos térmicos, formas químicas empleadas en productos enriquecidos, oleosas o pulverizadas) (USAID, 1999). Los alimentos se procesan por multitud de objetivos beneficiosos, como puede ser preservar y aumentar la vida útil del alimento, para aumentar la digestibilidad, aumentar la biodisponibilidad de nutriente, mejorar la palatabilidad y textura, para eliminar microorganismos, destruir toxinas o para crear “nuevos alimentos” (Williams y Erdman, 1996). Desafortunadamente, el procesado de alimentos puede hacer que disminuya el contenido de algún nutriente en ese alimento. Sin embargo, en la mayoría de los casos el beneficio que aporta el procesado a ese alimento está por encima de la pérdida de nutrientes, y si esto no es así se compensa con la adición de estos.

1.1.4. Metabolismo (absorción, transporte, almacenamiento y excreción) y estado nutricional.

1.1.4.1. Metabolismo de la vitamina A y de los carotenoides.

De las formas de vitamina A presentes en los alimentos, vitamina A preformada de origen animal y carotenoides provitamínicos A, el palmitato de retinilo se absorbe fácilmente

mientras que los carotenoides procedentes de vegetales son menos biodisponibles (Thurnham y Northrop-Clewes, 1999). En cuanto a la absorción, existe controversia sobre los mecanismos de absorción, ya que puede ser por difusión pasiva o facilitada y saturable según las cantidades utilizadas y tipos de estudios (Harrison y cols, 2001, 2005). Los datos disponibles sobre porcentaje de absorción varían según la matriz utilizada y otros parámetros. Así, a partir de cápsulas (por tanto fuera de la estructura alimentaria) distintos estudios indican un porcentaje de alrededor del 70% (Berr & Kern, 1984; Biesalski, 1991; Blomhoff, 1994; IOM, 2001), dependiendo de la cantidad y calidad de la grasa ingerida con el nutriente, mientras que la eficacia de absorción de la vitamina A en sujetos sanos y con ingestas de grasa >10 g/ día parece ser mayor del 80% (Borel y cols, 1998).

En principio no parece haber metabolismo de la vitamina A en el estómago humano (Borel y cols, 2001) y existe acuerdo en la comunidad científica de que todos los ésteres de retinilo son hidrolizados por enzimas pancreáticas vertidas en el lumen intestinal y/o por las retinil éster hidrolasas presentes en la membrana del enterocito, convirtiéndose en retinol, antes de su incorporación en células intestinales (enterocitos) (Borel y cols, 2001, Debier & Larondelle, 2005). En el caso de los carotenoides provitamínicos, estos son captados por los enterocitos, donde pueden ser convertidos a retinol (Olson, 2001). En los enterocitos, el retinol es esterificado con ácidos grasos de cadena larga formando ésteres de retinilo preferiblemente con ácido palmítico (Ball, 1998). La esterificación del retinol viene provocada por dos enzimas la ARAT (Acil Coenzima A Retinol Acil Transferasa) y la LRAT (Lecitin Retinol Acil Transferasa).

Los ésteres de retinilo formados en el enterocito se incorporan a los quilomicrones que se forman en el enterocito durante la absorción de los lípidos presentes en la luz intestinal

(Berr & Kern, 1984; Blomhoff, 1994). Estos quilomicrones están formados por triglicéridos, fosfolípidos y colesterol, junto con carotenoides, ésteres de retinol y otras vitaminas liposolubles y son vertidos a la linfa intestinal desde donde pasan al torrente circulatorio. La síntesis y secreción de quilomicrones están relacionadas con la tasa de absorción de lípidos de la dieta. La composición de las lipoproteínas que son ensambladas en los enterocitos depende de las moléculas que son absorbidas, de forma que el enterocito utiliza los lípidos absorbidos para la formación de quilomicrones (German & Dillard, 2006). Los triglicéridos de los quilomicrones son hidrolizados por la lipoproteína lipasa y como resultado final se forma un quilomacrón residual o remanente, de menor tamaño, parcialmente enriquecido en ésteres de colesterol y que contiene carotenoides, ésteres de retinilo y a la vitamina E (Blomhoff, 1994). Los quilomicrones remanentes son captados por el hígado.

Alrededor del 90% de la vitamina A absorbida se almacena en el hígado (células estrelladas) fundamentalmente en forma de ésteres de retinilo, y predominantemente como palmitato y estearato de retinilo, y el resto se distribuye en otros tejidos (Underwood, 1984; Harrison, 1998). La vitamina A en sangre se encuentra principalmente en forma de alcohol, retinol, y circula formando un complejo con dos proteínas sintetizadas en el hígado, la RBP (retinol binding protein) y la transtirretina (prealbúmina) (Blomhoff, 1994; Li & Tso, 2003). En cuanto a carotenoides, no ha sido identificada ninguna proteína específica en su transporte, siendo vehiculizados en sangre por las lipoproteínas (Stahl y cols, 2002).

En condiciones normales los niveles de retinol en sangre están regulados homeostáticamente dentro de un rango entre 1-2,8 $\mu\text{mol/L}$ y sólo si las reservas de retinol en hígado disminuyen, los niveles de retinol en plasma disminuyen significativamente. Por ello, las concentraciones de retinol en sangre no están directamente relacionadas con la cantidad de

vitamina A ingerida en la dieta. Aproximadamente entre un 5 y un 20% de la vitamina A ingerida (preformada) y un elevado porcentaje de carotenoides provitamínicos no son absorbidos en el tracto intestinal y son eliminados a través de las heces.

1.1.4.2. Metabolismo de la vitamina E

La eficacia de la absorción del tocoferol varía considerablemente dependiendo de las condiciones y los métodos de estimación. En general, la absorción de vitamina E en humanos es incompleta, y aunque no se conoce con certeza, a partir de alimentos se estima una absorción entre el 15 – 65 % (Sokol, 1996; Borel y cols, 2001). La absorción de vitamina E es un proceso pasivo, y la eficacia de la absorción puede disminuir con dosis altas, aunque los datos son dispares (Stahl y cols, 2002). La cantidad de vitamina E absorbida depende de la cantidad y tipo de lípidos que le acompañan en la dieta. Los triglicéridos de cadena media aumentan su absorción, en tanto que los ácidos grasos poliinsaturados la inhiben (Machlin, 1991). Por otra parte, cuando se administran grandes cantidades de tocoferol o de acetato de tocoferilo se alcanzan concentraciones más elevadas con el primero (Machlin, 1991).

La absorción de la vitamina E es máxima en la porción media del intestino delgado, no absorbiéndose en el colon. Sólo las formas libres del tocoferol aparecen en quilomicrones, los ésteres de tocoferol son hidrolizados en el tracto gastrointestinal (Stahl y cols, 2002). Comparado con la vitamina A, la cinética de absorción presenta un retraso de media hora en la aparición de α -tocopherol en quilomicrones, lo que sugiere que la cinética de absorción de la vitamina E es diferente a la de vitamina A. Para explicar esto algunos autores sugieren que el transporte del α -tocopherol en el enterocito es menos eficiente que el de la vitamina A (Borel y cols, 2001).

En hígado de humanos ha sido descrita la presencia de una proteína de unión citosólica (α -TTP, α -tocopherol transfer protein) que une preferencialmente la forma α -tocoferol frente a otras formas de tocoferoles (ej. γ -tocoferol) y las incorpora en VLDL nacientes (Hosomi y cols, 1997; Chow, 2001).

La vitamina E circula en sangre en forma libre (principalmente como α -tocoferol) y no tiene un transportador específico en sangre, siendo vehiculizada en las lipoproteínas del suero. En humanos aproximadamente la mitad del α -tocoferol es transportado por las LDL y la otra mitad es transportada por las fracciones VLDL y HDL (Traber y cols, 1992; Mardones & Rigotti, 2004). Existe una buena correlación entre lípidos, colesterol sérico y niveles de tocoferol en plasma (Thurnham y cols, 1986).

La vitamina E (α -tocoferol) forma parte de la membrana de eritrocitos y plaquetas. Su concentración en tales células, también refleja el nivel plasmático de esta vitamina. En sangre se encuentra también γ -tocoferol, aunque en niveles entre 5 y 10 veces menores que los de α -tocoferol, a pesar de que existen algunos alimentos muy ricos en esta forma de vitamina E (Debier & Larondelle, 2005). Este fenómeno es resultado de factores distintos a los implicados en el proceso de absorción (Chow, 2001).

La vitamina E está ampliamente distribuida por todo el cuerpo, fundamentalmente en las membranas celulares. Las concentraciones más altas de vitamina E se encuentran en tejido adiposo y glándulas suprarrenales, siguiéndole en orden decreciente la hipófisis, testículos y plaquetas. Los tejidos adiposo, hepático y muscular constituyen los principales depósitos de la vitamina, almacenándose como α -tocoferol libre. La concentración de γ -tocoferol en plasma representa entre el 10 y 20% del tocoferol total, pero en tejidos (adiposo y piel) su concentración llega a ser del 20-50% (Machlin, 1991; Sokol, 1996; Stahl y cols, 2002).

La principal ruta de excreción del tocoferol absorbido es la eliminación fecal y generalmente menos del 1% de la cantidad ingerida es excretada en orina. El exceso de alfa-tocoferol y otras formas de tocoferoles se excretan primero por la bilis y después pasan a las heces (Chow, 2001).

1.1.4.3. Estatus nutricional de vitaminas A y E.

La relación entre ingesta y estatus nutricional no siempre es directa, ya que el estatus está en relación no sólo con la ingesta sino también con la biodisponibilidad del nutriente y el metabolismo de éste en el organismo.

La forma más exacta de medir el *estatus nutricional de vitamina A* sería realizar una biopsia hepática, pero como esto es muy invasivo, se han desarrollado otras formas de medir indirectamente el estatus nutricional de vitamina A como son los procedimientos clínicos (ej. manchas de Bitot, xerosis corneal, queratomalacia), funcionales (ej. test de adaptación visual a la oscuridad y test de la respuesta relativa a dosis), bioquímicos (ej. niveles plasmáticos) y fisiológicos (ej. test de impresión citológica). Para la valoración del estado nutricional se suele utilizar la determinación de niveles de retinol en suero o plasma (venosa o capilar). En estos estudios que valoran retinol en sangre capilar, la concentración de retinol muestra una buena correlación con los datos obtenidos en suero de población sana (Craft, 2001; Granado y cols, 2004).

La vitamina A se encuentra en el plasma como retinol, y del 5-10% está presente como ésteres de retinilo (Maiani y cols, 1993). Expertos definieron el punto de corte para considerar un estatus nutricional de deficiencia grave de vitamina A un nivel menor de 0,35 $\mu\text{mol/L}$

(10µg/dL) de retinol en suero o plasma. Niveles entre 0,35-0,70 µmol/L (10-20 µg/dl) se relacionan con reservas hepáticas bajas (nivel marginal) y niveles normales cuando la cantidad de retinol era mayor de 0,70 µmol/L (20µg/dL) (OMS, 1982; Olson, 1996). Según una reciente declaración del "International Vitamin A Consultative Group" (IVACG) se introduce el término "desórdenes por deficiencia de vitamina A" para referirse a todas las alteraciones fisiológicas causadas por un estado de vitamina A deficitario, incluidas las manifestaciones y síntomas subclínicos, y define la "deficiencia de vitamina A" como niveles de vitamina A inferiores 0,70µmol/L (20µg/dl), el doble de la concentración adoptada en 1980 (IVACG, 2003).

Los niveles de vitamina A en sangre están regulados por mecanismos homeostáticos y por tanto, los niveles en plasma de vitamina A de los individuos no reflejan el estatus nutricional de vitamina A si están dentro del rango de normalidad (Underwood, 1984; WHO, 1982). En población europea en la que las dietas contienen cantidades adecuadas de vitamina A, los niveles de retinol en plasma entre 1,05 – 2,80 µmol/L indican niveles de reserva hepáticos adecuados (Underwood, 1984). La curva de distribución de la vitamina A en el plasma en estudios de población, resulta útil para observar si una población tiene un aporte dietético adecuado.

Los niveles de retinol están en relación con dos factores del individuo, el sexo y la edad. Las concentraciones de retinol sérico se incrementan desde el nacimiento a la edad adulta y, en la mayoría de las poblaciones, los hombres presentan niveles plasmáticos superiores a las mujeres (Underwood, 1984, Olmedilla y cols, 1997).

En cuanto a los carotenoides, que se encuentran de forma habitual en sangre y tejidos humanos, su concentración en sangre no está asociada de forma directa con ninguna patología

concreta, aunque sí con el mayor o menor riesgo de padecer diversas enfermedades crónicas (IOM, 2000). La medida del estatus nutricional de carotenoides se puede realizar mediante procedimientos bioquímicos (niveles en suero plasma o tejidos), funcionales (ej. medida del daño tisular o celular del DNA, inhibición de la oxidación de las LDL), clínicos (carotenodermia) y dietéticos (ej. registros de dieta). El valor de referencia de carotenoides en suero varía según las poblaciones, considerando concentraciones normales en población europea entre 1,92–2,89 $\mu\text{mol/L}$ (Olmedilla y cols, 1992, 1997; 2001; Granado y cols, 1998).

El *estatus nutricional de vitamina E* también se mide de diversas formas, bien mediante métodos estáticos (ej. en plasma, eritrocitos, plaquetas, la razón vitamina E y lípidos, en tejido adiposo) o bien utilizando pruebas funcionales (ej. hemólisis de eritrocitos, producción de pentano, formación de malonildialdehído en eritrocitos, determinación de la susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad a oxidación y determinación de dienos conjugados) (Chow, 2001).

Las concentraciones de α -tocoferol en suero o plasma indicadas como deficientes están por debajo de 11,6 $\mu\text{mol/L}$ (500 $\mu\text{g/dL}$), niveles bajos 11,6-16,2 $\mu\text{mol/L}$ (500-700 $\mu\text{g/dL}$) y niveles aceptables por encima de 16,2 $\mu\text{mol/L}$ (>700 $\mu\text{g/dL}$) (Morrissey y cols, 1993).

Los niveles séricos tanto de α - como γ -tocoferol están altamente correlacionados con el colesterol sérico y la concentración total de lípidos (Traber, 1997; Márquez y cols, 2002) y por ello es útil referir la concentración de α -tocoferol respecto a colesterol o lípidos totales como índice de estatus nutricional (Machlin, 1991), siendo 2,5 el punto de corte que indica un buen estatus vitamínico (Thurnham y cols, 1986; Machlin, 1991).

1.1.5.- Ingestas diarias recomendadas de vitaminas A y E.

Las primeras recomendaciones de ingesta para vitaminas fueron emitidas por la National Academy of Science de Estados Unidos (Recommended Dietary Allowances, RDA) en 1945. Se definieron como “los niveles de ingesta media de nutrientes, en base a los conocimientos científicos, que este organismo juzga como adecuados para cubrir las necesidades nutricionales conocidas de prácticamente todas las personas sanas”. A este respecto, es interesante diferenciar entre dos conceptos aparentemente similares, la *necesidad nutricional*, es decir la ingesta suficiente para cubrir las necesidades fisiológicas, que idealmente se deberían alcanzar sin procesos de homeostasis extremos y excesiva depleción o exceso en los depósitos corporales y la *necesidad metabólica*, o la cantidad y forma química de un nutriente que es necesaria sistemáticamente para mantener la salud y el desarrollo normal sin alterar el metabolismo de cualquier otro nutriente. El concepto crucial entre ambos es la *biodisponibilidad*, definida como la fracción de nutriente ingerido que es absorbida y utilizada para las funciones fisiológicas normales o para su almacenamiento, y sobre la que influyen factores asociados a la digestión, absorción y disponibilidad celular (Olmedilla & Granado, 2000).

Los valores de ingesta diaria recomendada para la vitamina A en población sana española son de 1000 y 800 µg/día para hombres y mujeres, respectivamente (Moreiras y cols, 1997, 2004). El Institute of Medicine revisa estos niveles y recomienda 900 y 700 µg de actividad en equivalentes de retinol (RAE) / día para hombres y mujeres, respectivamente. Para los carotenoides los factores de conversión a vitamina A también están revisados (12, 24

y 24 μg = 1 μg de retinol para β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina, respectivamente) (IOM, 2001).

La concentración de carotenoides en la sangre es un buen indicador (marcador biológico) del consumo de frutas y verduras. Muchos estudios observacionales sugieren que concentraciones elevadas en sangre de β -caroteno y otros carotenoides están asociados con bajo riesgo de enfermedades crónicas (Fairfield & Fletcher, 2002). Sin embargo, esta evidencia aunque consistente, no se puede utilizar para establecer los requerimientos de β -caroteno u otros carotenoides porque los efectos pueden ser debidos a otras sustancias encontradas en los alimentos ricos en carotenoides (frutas y verduras).

Los valores de ingesta diaria recomendada para la vitamina E en población sana española son de 12 mg/día de vitamina E tanto para hombres como para mujeres (Moreiras y cols, 1997, 2004). El Institute of Medicine en su última revisión (IOM, 2000) indica que las cantidades diarias recomendadas de vitamina E para hombres y mujeres son de 15 mg/ día. Estas cantidades se refieren a cantidades de α -tocoferol dado que las otras formas naturales de vitamina E (β , γ y δ - tocoferoles) aunque son absorbidas, en humanos no contribuyen a la actividad vitamínica E. La RDA para la vitamina E es mayor que en las anteriores ediciones (12mg/día) dado que hay estudios experimentales que sugieren que ingestas elevadas de vitamina E pudieran disminuir el riesgo de padecer algunas enfermedades crónicas, especialmente enfermedades cardiovasculares (IOM, 2000; Traber, 2006).

1.2 Leche entera y enriquecidas.

1.2.1. Definiciones.

La primera definición de leche data del I Congreso Internacional para la Represión de los Fraudes en los Alimentos (Ginebra 1908) donde se definió como “el producto íntegro del ordeño completo e ininterrumpido de una hembra lechera sana, bien alimentada y no fatigada. Ha de ser recogida higiénicamente y no debe contener calostro”. Más tarde en el código alimentario se recoge una definición en la que se indica que es el “producto íntegro, no alterado, ni adulterado y sin calostros, que se obtiene del ordeño higiénico, regular, completo, ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas” (Código Alimentario, 1991). Con el término leche se hace referencia explícita a la de vaca, ya que si fuera de otro animal habría que especificarlo (Código Alimentario, 1991)

Según el Codex Alimentarius en 1987 (citado en el Reglamento (CE) N° 1925/2006), la definición de “fortificación o enriquecimiento” permite la adición de nutrientes a los alimentos con el fin de prevenir o corregir una deficiencia de uno o más nutrientes en la población, o en un grupo específico de la población que pueda ser demostrada con los medios científicos de prueba existentes o mediante estimaciones sobre la ingesta de nutrientes a raíz de los cambios en los hábitos alimenticios.

Los términos “fortificado”, “enriquecido” y “suplementado” se han utilizado indistintamente. Ball (1998) recogió algunas definiciones de las distintas formas de aumentar el contenido de vitaminas en alimentos, en las que diferenciaba los términos: “restoration”, como la restitución (total o parcial) de las vitaminas perdidas durante un proceso (ej la adición de las vitaminas A y D en la leche desnatada en polvo y la adición de vitamina D a la

leche evaporada); “fortification”, se refiere a la adición de vitaminas, las cuales no necesariamente forman parte del alimento de forma natural (ej. la adición de vitamina A a la margarina, con el fin de aumentar la vitamina A ingerida en la dieta cuando se sustituye la mantequilla por margarina); “enrichment”, hace referencia a la adición de vitaminas por encima de los valores que naturalmente contiene el alimento, para hacer un producto más comercial; “standardization”, denomina a la adición de vitaminas para compensar las fluctuaciones en el contenido de vitaminas naturales (ej. en la leche y mantequilla las variaciones de contenido de las vitaminas A y D debidas a cambios estacionales); “nutrification”, implica la adición de vitaminas a alimentos formulados o fabricados industrialmente.

1.2.2. Composición.

La leche es una compleja dispersión coloidal de glóbulos de grasa y proteínas en una solución acuosa con lactosa, minerales y otros constituyentes en menor proporción (Jensen, 1995). El contenido de nutrientes en la leche puede ser modificado tecnológicamente tanto por adición, eliminación total o parcial de nutrientes como por pérdida de algunos compuestos tanto en el procesado como en el almacenamiento. Esencialmente, la leche está compuesta por 87,4% de agua, 3,7% de grasa, 3,4% proteínas, 4,8% lactosa y 0,7% minerales (Holden y cols, 1999). La leche es un alimento con una alta densidad de nutrientes.

El 80% de las proteínas de la leche corresponde a la caseína (fracción proteica que se puede separar electroforéticamente en cuatro componentes mayoritarios: alfa, beta, gamma, kappa caseínas) y el 20% restante corresponde a proteínas de suero (α -lactoalbúmina, y β -

lactoglobulina). La leche de vaca es una excelente fuente de proteínas de alta calidad, con un alto valor nutricional dado que proporcionan gran cantidad de aminoácidos esenciales (Hinrichs, 2004). Los últimos estudios relacionados con la fracción proteica de la leche están dirigidos a la digestión de esta fracción con enzimas proteolíticas dando lugar a pépticos bioactivos sobre los cuales se investiga su posible actividad en el tratamiento de determinadas enfermedades humanas (ej. hipertensión arterial) (Shah y cols, 2000; Hinrichs, 2004).

El principal hidrato de carbono de la leche es la lactosa y en menor cantidad la leche presenta glucosa y galactosa. En cuanto a la grasa de la leche, es una grasa con unas características físicas, químicas y biológicas muy particulares. Esta grasa contribuye a la apariencia, textura, aroma y saciedad de los productos lácteos. La grasa de la leche es una fuente de energía, ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles. La composición de la grasa de la leche está basada fundamentalmente en triglicéridos (97-98%) y también contiene fosfolípidos, esteroides libres (colesterol, escualeno), ácidos grasos libres y vitaminas liposolubles.

Los ácidos grasos que contiene la leche son muy numerosos y de longitudes de cadena muy distintas (4-26 átomos de carbono). La grasa de la leche es única porque contiene una proporción relativamente alta de ácidos grasos saturados de cadena corta y media, frente a otras grasas de origen animal. En general, se puede decir que la grasa de la leche esta compuesta por un 65% de grasa saturada. El 73-78% de los ácidos grasos de la leche son de cadena larga (mayor de 16 átomos de carbono). Además de variedad en la longitud de la cadena de los ácidos grasos, también existe diferencia en el grado de saturación; aproximadamente un 65% son ácidos grasos saturados, el 32% son monoinsaturados y el 3%

son poliinsaturados. Los ácidos grasos presentes en mayor cantidad en la leche son el ácido mirístico (14:0), palmítico (16:0) y esteárico (18:0). En cuanto a los ácidos grasos insaturados, el ácido oleico (18:1) es el más representativo, aunque también se encuentran los ácidos linoléico (18:2) y linolénico (18:3) en pequeñas cantidades. En la composición de los ácidos grasos de la leche influye la composición del alimento de los animales (Juarez, 1985; Jensen, 1996, 2002 German y Dillard, 2006). Entre otros componentes de la leche se encuentran los carotenoides, entre los que destaca el β -caroteno (con actividad provitamínica A) responsable de la coloración de la grasa. El contenido de β -caroteno no es fijo y depende del forraje recibido por el animal y época del año (Indyk y cols, 1993).

1.2.2.1. Contenido de vitaminas A, E y carotenoides.

El contenido de vitaminas en leche cruda varía en función de la estación del año, raza y alimentación de la vaca (Juárez, 1985; Hicks y cols, 1996).

La leche cruda contiene casi todas las vitaminas, cuya concentración varía según los distintos tipos de tratamientos de higienización (pasteurización, “Ultra-Hight-Temperature” (UHT), esterilización) (Brinkmann y cols, 1993). La vitamina C se encuentra en la leche cruda en muy pequeña cantidad (2 mg/100ml) y dado que es termolábil, durante los tratamientos de higienización, su contenido disminuye a la mitad. El contenido de vitamina B₁ (tiamina) se encuentra modificado en el proceso de UHT. El contenido en vitaminas A y E en leche y derivados lácteos, según análisis propios, tiene como forma predominante de vitamina A al palmitato de retinilo, aunque también están presentes otras formas éster en menor proporción y β -caroteno (*trans*, *cis*) como el principal carotenoide provitamínico-A

(Herrero, 2003; Herrero-Barbudo y cols, 2005). Respecto a la vitamina E, los análisis revelan la presencia de α -tocoferol libre. La industria lechera ha modificado este alimento, de manera que lo que inicialmente no era una buena fuente de vitamina E, aplicando nuevas tecnologías de adición de nutrientes puede convertirse en una buena fuente de este micronutriente. En los productos enriquecidos las formas añadidas de vitaminas A y E son acetatos de retinilo y de tocoferilo respectivamente (Herrero-Barbudo y cols, 2005). En algunos productos (ej. margarinas enriquecidas con vitamina A) la forma añadida es β -caroteno, utilizado además como colorante.

Por otra parte, hay estudios que hacen referencia a la pérdida en el contenido de vitaminas según las condiciones de almacenaje (temperatura, luz, ausencia de oxígeno, tiempo) (Vidal-Valverde y cols, 1992 y 1993).

1.2.3. Valor nutricional y factores que afectan a la digestibilidad de la leche.

La leche contiene proteínas (ej. caseína) de alta calidad o valor nutritivo, ya que su digestibilidad (proporción de nitrógeno proteico ingerido que es absorbido) es del 95% y el valor biológico (porcentaje de nitrógeno proteico ingerido y retenido por el organismo) es del 75% (FAO, 2006). Respecto a la digestión de la grasa de la leche, algunos autores indican la importancia que tienen la localización de los ácidos grasos saturados, concretamente la del ácido palmítico, en la estructura del triglicérido, ya que los ácidos grasos situados en las posiciones 1 y 3 del glicerol son fácilmente hidrolizados por las lipasas (especificidad de la enzima por el sustrato), y tanto los monoglicéridos con palmítico en la posición 2 (localización más frecuente del ácido palmítico en los triglicéridos de la leche) como los

ácidos grasos libres (de cadena más corta, saturados o insaturados) son absorbidos, reesterificados y secretados al plasma. De esta manera, la posición de los ácidos grasos en el triglicérido modula la absorción de nutrientes (German y Dillard, 2006).

No obstante, la información sobre biodisponibilidad de vitaminas a partir de alimentos que hayan sufrido alguna transformación industrial en su composición (desnatados, enriquecidos) es escasa, y en general, se debe considerar que el procesado de los alimentos puede tener un efecto positivo o negativo sobre la biodisponibilidad de las vitaminas (Van den Berg, 1993).

1.2.4. Alimentos enriquecidos y alimentos funcionales.

La industria lechera ha desarrollado y comercializado alimentos modificados a los que ha eliminado parcial o totalmente algunos componentes (ej. grasa), aumentado el contenido de algún nutriente (ej. vitaminas A y E) o incluyendo otros con objeto de proporcionar un valor añadido por los potenciales beneficios para la salud (alimentos funcionales). Según un *documento europeo de consenso* “un alimento puede considerarse como funcional si es demostrado de forma satisfactoria que tiene efecto beneficioso sobre una o más funciones dianas en el organismo, aparte de los efectos nutricionales adecuados, de forma que sea relevante tanto para mejorar el estado de salud y bienestar, o para la reducción de riesgo de enfermedad” (Diplock y cols, 1999). Estos alimentos han de consumirse dentro de una dieta variada y sin sustituir a otros alimentos. Sus beneficios van dirigidos, no a la población general, sino a determinados grupos de población, según el diseño del alimento.

La disponibilidad de productos lácteos enriquecidos hace que estos puedan convertirse en mejor fuente de distintos nutrientes (vitamina A y vitamina E), respecto a los productos tradicionales (o sin modificar), y esto es importante sobre todo para determinados grupos de la población, etapas de la vida o situaciones fisiológicas (Keane y cols, 1998; Barr y cols, 2000; Herrero y col, 2002). Los alimentos funcionales, consumidos como parte de una dieta equilibrada y acompañados de un estilo de vida saludable, ofrecen la posibilidad de mejorar la salud y/o prevenir ciertas enfermedades. Por ejemplo, estudios recientes en humanos consumiendo leche enriquecida con vitaminas y ácidos grasos omega-3 durante dos meses han observado una reducción en la concentración de colesterol total en un 6% y el LDL colesterol (ca. 16%) en sangre de sujetos normolipémicos (Baro y cols, 2003).

Diversos autores consideran que la incorporación de alimentos enriquecidos en la dieta es la forma más barata de aumentar la ingesta de nutrientes (Briend, 2001). En este contexto, en el Reglamento Europeo (CE N° 1925/2006) se indican las posibles situaciones en las cuales se pueden añadir vitaminas. Se recogen los casos de *equivalencia nutricional* para presentar un valor nutritivo semejante en términos de cantidad y biodisponibilidad, o para obtener un *alimento sucedáneo*, alimento diseñado para parecerse a un alimento usual en su aspecto, textura, sabor, y olor y que se destina a ser utilizado como un sustituto completo o parcial del alimento al que se parece (ej. adición de vitaminas A y D a la margarina para que simule a la mantequilla) o los casos de *fortificación o enriquecimiento*, que consiste en la adición de una o más vitaminas o minerales en un alimento independientemente de si están o no contenidos normalmente en él.

Según este reglamento (CE N° 1925/2006) los alimentos pueden enriquecerse en base a: “1) la deficiencia de una o más vitaminas en la población o en grupos específicos de

población demostrada con pruebas clínicas o subclínicas de deficiencia o puedan deducirse a partir de estimaciones que indiquen niveles bajos de ingesta de nutrientes, 2) la posibilidad de mejorar el estado nutricional de la población o de corregir posibles deficiencias en la ingesta diaria de vitaminas debidas a cambios en los hábitos alimenticios y 3) los progresos de los conocimientos científicos reconocidos generalmente sobre el papel de las vitaminas en la nutrición y los consiguientes efectos para la salud”.

El tema de las alegaciones de salud es cada vez más importante y trata de ser regulado por el Reglamento (CE nº 1924/2006) con entrada en vigor el 1 de julio de 2007, con el objetivo de proteger a los consumidores y potenciar la innovación de productos dentro de la industria alimentaria. El mayor reto para los científicos actualmente y en el futuro será investigar las posibilidades en cuanto a nutrición y estudiar la relación existente entre un alimento o uno de sus componentes y la mejora del estado de salud y bienestar o la disminución de enfermedades. Finalmente, es muy importante la correcta comunicación a los consumidores de los potenciales beneficios para su salud que ofrece el producto alimentario, de forma que puedan elegir los alimentos en base a una correcta y completa información.

1.2.5. Consumo de leche y productos lácteos en España.

El consumo de lácteos en España en 1995, según el INE (Instituto Nacional de Estadística) era de 375 g/ persona/ día, cantidad que aportaba el 21% de la vitamina A de la dieta. En los últimos diez años, el consumo de leche líquida ha disminuido y se ha producido un aumento simultáneo en la ingesta del yogur, queso y otros derivados lácteos. En general, el uso de mantequilla y margarina es extraordinariamente bajo.

Según un informe elaborado por el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA) a partir de los datos del Panel de Consumo del 2005, el consumo de leche en España ha pasado de 96,9 litros / persona /año en 2001 a 87,3 litros/persona/año.

En el panel de Consumo (MAPA, 2004) se recogieron por primera vez los datos referentes al consumo de leche líquida enriquecida en España, alcanzando el 16% del consumo total, porcentaje que ha aumentado en 2005 hasta el 17,6% (MAPA, 2006). De este informe se deduce que las leches semidesnatadas, desnatadas y enriquecidas aumentan su importancia en el consumo de lácteos. La leche entera supone el 32% del consumo total de leche, disminuyendo un 5% respecto al año anterior. La leche semidesnatada aumenta un 3,52% y la desnatada aumenta un 0,31%. El consumo de derivados lácteos también aumentó un 4%.

1.3. Biodisponibilidad.

1.3.1. Definición.

El término biodisponibilidad está tomado del campo de la farmacología, donde se define como “la fracción de una dosis oral (compuesto del que parte o metabolito activo) de una preparación concreta que alcanza la circulación sistémica” (Schumann y cols, 1997). En la biodisponibilidad se pueden diferenciar los aspectos de *biodisponibilidad absoluta*, cuando se inyecta el fármaco vía intravenosa y tras un cierto tiempo se determina la cantidad en circulación sistémica y el de *biodisponibilidad relativa*, cuando el fármaco se administra vía

oral y se analiza la cantidad que hay en sangre tras un tiempo después de la ingesta (Obech-Vidal y cols, 1990).

En nutrición, el concepto de biodisponibilidad es más amplio y hace referencia a la cantidad de nutriente ingerida que es absorbida y convertida en forma activa para su uso o almacenaje (Bender, 1989). Este término incluye los conceptos de bioaccesibilidad, bioconversión y bioeficacia. La *bioaccesibilidad* (sinónimo de digestibilidad) se refiere a la cantidad de nutriente procedente del alimento y que esta disponible para su *absorción*; la *bioconversión* y/o *bioactividad* es la cantidad de nutriente transformado en el cuerpo en formas activas (Stahl y cols, 2002); y el término *bioeficacia*, combina ambos conceptos y expresa la eficacia con la cual el nutriente ingerido es absorbido y convertido en forma activa (Castenmiller & West, 1998).

1.3.2. Metodología: Estudios de biodisponibilidad.

La estimación de la biodisponibilidad de componentes de la dieta es esencial para conocer el papel de los micronutrientes en la salud y su relación con determinadas enfermedades, así como para evaluar la necesidad de intervención nutricional. La medida de biodisponibilidad de vitaminas liposolubles y carotenoides presenta algunos problemas específicos de este grupo de compuestos, ya que son moléculas no polares y dependen, por tanto, de la solubilización en micelas para su absorción.

Los estudios de biodisponibilidad de vitaminas en humanos se pueden llevar a cabo por diferentes métodos sobre los que se puede encontrar información ampliada en revisiones recientes (Biesalski, 1997; Granado-Lorencio & Olmedilla-Alonso, 2003). La mayoría de los

métodos sólo proporcionan información respecto a la biodisponibilidad relativa (respecto a una dosis de referencia o control) pero no respecto a la biodisponibilidad absoluta de vitaminas. En este sentido, los estudios a corto plazo, incluyendo o no procedimientos de saturación, utilizan dosis de vitaminas elevadas para provocar un cambio cuantificable en sangre o su excreción en orina. Los estudios en humanos se pueden dividir, básicamente, en los que utilizan dosis elevadas (o farmacológicas), que están sólo parcialmente disponibles debido a limitaciones en los procesos de absorción, y aquellos en los que se investigan ingestas de vitaminas en cantidades “más fisiológicas”, suministradas tanto como sustancia pura como en diferentes tipos de matrices (ej. alimentos).

En humanos se han utilizado diferentes protocolos, bien a corto plazo, como son los de dosis únicas, estudio farmacocinético (área bajo la curva), o bien, a largo plazo, estudios de suplementación a dosis múltiples. A partir de estos protocolos no se obtiene el mismo tipo de información, dado que se interpretan en términos de metabolismo postprandial o bien de procesos de repleción y/o de saturación, respectivamente. En estudios a largo plazo, se puede evaluar la mejora en el estado nutricional de vitaminas cuando se parte de situaciones de deficiencia, mediante la administración de dosis simples o múltiples. No obstante, no se ha validado ninguna de las metodologías descritas para el estudio de biodisponibilidad de vitaminas (Granado-Lorencio & Olmedilla-Alonso, 2003).

Los estudios de biodisponibilidad a dosis única tratan de valorar la absorción postprandial (área bajo la curva) y, generalmente, es una técnica válida para hacer estudios a corto plazo (8 - 24 horas). No obstante, dado que las vitaminas están presentes de forma endógena, se ha propuesto como mejor modelo para valoración de su absorción relativa en humanos el estudio de la fracción de lipoproteínas ricas en triglicéridos (mayoritariamente quilomicrones)

(Jesse, 1988; Van Vliet y cols, 1995; Brown y cols, 2004). Aunque implica una tecnología más sofisticada y cara, una alternativa es la utilización de isótopos estables ya que permite medir la cantidad de vitamina marcada ingerida que se encuentra en sangre frente a las formas endógenas (Jesse, 1988; Cohn, 1997; Russell y cols, 2001; Hayes y cols, 2001; Jeanes y cols, 2004).

Debido a las diversas limitaciones existentes, se han realizado muchos estudios utilizando modelos animales. Sin embargo, aunque los modelos animales pueden proporcionar información relevante respecto a la biodisponibilidad en el hombre, existen diferencias cuali y cuantitativas en el metabolismo y cinética de las vitaminas entre animales y humanos (van den Berg, 1993). En otros estudios se han utilizado modelos *in vitro*, con o sin cultivos celulares, en los que se simulan las condiciones necesarias de digestión (enzimas y condiciones fisiológicas) y absorción de nutrientes (Quick & Ong, 1990; Liu y cols, 2004). Finalmente, se han empleado modelos compartimentales para describir la absorción, redistribución y almacenamiento / eliminación de nutrientes en el organismo (Wilson & Dainty, 1999).

En cuanto a la biodisponibilidad de vitaminas a partir de la leche y productos lácteos, están publicados pocos estudios y sobre pocas vitaminas, en concreto, sobre vitamina B₁₂ a partir de leche y pan enriquecido (Russell y cols, 2001), sobre ácido fólico a partir de leche pasteurizada y UHT en humanos (De Jong y cols, 2005) y sobre vitamina D a partir de quesos enriquecidos (Johnson y cols, 2005).

1.3.3. Factores que afectan a la biodisponibilidad de vitaminas y carotenoides.

Los diversos factores que pueden influir en la biodisponibilidad de vitaminas se pueden englobar en el acrónimo SLAMANGHI, que fue acuñado originalmente para carotenoides. Este acrónimo hace referencia a las eSpecies (distintas formas químicas, vitámeros) presentes en el alimento, a las uniones moLeculares, a la cAntidad ingerida, a la Matriz del alimento, al efecto de modificadores de la Absorción (ej. porcentaje de grasa), el estatus Nutricional del sujeto, a los factores Genéticos, a los factores relacionados con el Huésped (ej. parásitos intestinales) y a las Interacciones (De Pee y cols, 1996). Posteriormente, el mismo grupo de investigación que lo acuñó, modificó el término a SLAMENGHI, donde la E hace referencia a los “efectores” de absorción y bioconversión (West y Castenmiller, 1998). Una revisión reciente, recoge estos factores y discute su influencia sobre la absorción no sólo de vitaminas y carotenoides sino también de fitoesteroles (Borel, 2003).

1.3.3.1. Factores asociados al alimento

La *bioaccesibilidad*, cantidad de nutriente procedente del alimento que esta disponible para su absorción, puede estar modificada por multitud de procesos complejos, que incluyen factores asociados al alimento y procesos preabsortivos. Entre ellos se encuentran el estado del alimento (crudo, cocinado), el tamaño de partícula, la composición del alimento, las enzimas digestivas y productos de la digestión, el tiempo de liberación al duodeno y yeyuno

(ej. vaciado gástrico), la presencia de sales biliares, la liberación desde la matriz del alimento y su solubilización en micelas (Stahl y cols, 2002; Faulks & Southon, 2005).

En cuanto a la influencia de la *forma química* en que se encuentre el nutriente, está descrito que para la vitamina E la absorción de las formas éster (acetato y succinato de tocoferilo) es menor que cuando la vitamina E se encuentra libre (α - tocoferol) (Kelleher & Losowsky, 1970 Biesalski, 1997; Hayes y cols, 2001; Jeanes y cols, 2004; Lodge y cols, 2004). Asimismo, la forma de vitamina E encapsulada (acetato de tocoferilo) fue absorbida más eficazmente que el succinato de tocoferilo solubilizado en agua (Hayes y cols, 2001). Por otro lado, la forma natural (α -tocoferol) mostró ser más biodisponible que la forma sintética cuando las dosis orales utilizadas eran bajas (20-50mg/d) lo que vuelve a mostrar que existe alguna relación entre la forma química del nutriente presente en el alimento (natural, procedente de aceites, o sintética a partir de preparados oleosos o acuosos) y su absorción (Borel, 2003). Respecto a la vitamina A, un estudio en humanos comparó el uso de las formas comercialmente disponibles de palmitato de retinilo (miscibles en agua o en aceite) observándose que el pico de concentración ($C_{\text{máx}}$) se alcanzaba entre los 120-150 minutos con ambas formas, aunque la absorción (AUC) era mayor con la forma acuosa (Renuka y cols, 2001).

Otro factor que influye sobre la biodisponibilidad de vitaminas es la *cantidad de nutriente ingerida* (A: “amount”). A este respecto, Borel y cols. (1997) muestran que la respuesta post-prandial del α -tocoferol en quilomicrones, utilizando cantidades muy superiores a las que se encuentran en la dieta habitual de humanos, es proporcional a la dosis ingerida (hasta 937 UI de acetato de α -tocoferilo).

La *matriz* (M) de los alimentos afecta a la accesibilidad de los micronutrientes para su posterior absorción (ej. la concentración de β -caroteno en suero tras la ingestión de zanahorias es menor que tras su ingesta como suplementos, así como también son diferentes al tomarlo procedente de alimento crudo o cocinado (Brown y cols, 1989, van het Hof y cols, 200b;). La rotura de la estructura de la matriz (debido al cortado, triturado, formas de cocinado, etc.) afecta a la accesibilidad de los nutrientes en el alimento (Van het Hof y cols, 1999; 2000a), facilitando la liberación de los nutrientes desde el alimento y su solubilidad para su absorción (Faulks y cols, 2004). Las cantidades de carotenoides cuantificadas en verduras españolas cocinadas son mayores que cuando se analizaban crudas (Granado y cols, 1992), y esto puede afectar a la biodisponibilidad de los carotenoides a partir de estas verduras.

El entorno físico-químico (matriz alimentaria) en el que se encuentran las vitaminas condiciona su absorción. Como ha sido mostrado en recientes estudios (Leonard y cols, 2004; Jeanes y cols, 2004), cuando se consumía una cápsula de vitamina E con distintos alimentos (leche, mantequilla, nata) que contenían igual cantidad de grasa (17,5 g), la respuesta obtenida en quilomicrones era diferente, obteniéndose la mayor respuesta con la ingesta de mantequilla. Esto sugería que el alimento proporciona un mejor medio para la absorción de vitamina E, concluyendo que las propiedades físicas del alimento afectan al vaciamiento gástrico y a su absorción (Jeanes y cols, 2004).

Otros factores que pueden afectar a la absorción de las vitaminas son los *modificadores de la Absorción* (A). Diversos estudios indican que la grasa de la dieta favorece la absorción de vitaminas y carotenoides (Jalal y cols, 1998; Brown y cols, 2004), en cambio otros indican que la biodisponibilidad de vitaminas y carotenoides es similar independientemente de que se consuman en dietas con alto o bajo contenido de grasa (3- 30 g

de grasa) (Borel y cols, 1997; Roodenburg y cols, 2000). Asimismo, no sólo la cantidad de grasa influye en la absorción de vitaminas sino también el tipo de grasa (Borel, 2003). Entre los posibles mecanismos por lo cuales la grasa favorecería la absorción se encuentran el hecho de proporcionar un ambiente hidrofóbico donde estos compuestos puedan solubilizarse, la estimulación de la secreción biliar y pancreática (lipasas y esterases) y consecuentemente permitir la producción de micelas y proporcionar componentes útiles para el ensamblaje de quilomicrones (Borel, 2003; Harrison, 2005).

Existen potenciales de *interacciones* (I) entre micronutrientes que afectan a su absorción y biodisponibilidad, y esto debería tenerse en cuenta cuando se planteen estrategias de enriquecimiento de alimentos para mejorar el aporte de nutrientes (Sandstrom, 2001). En estudios de biodisponibilidad de vitaminas A y E (en terneros), la ingesta de las vitaminas A y E separadas o de forma conjunta provoca una respuesta del α -tocoferol en plasma distinta; la ingesta de vitamina E sola provoca una mayor respuesta (α -tocoferol en plasma) que la ingesta conjunta de ambas vitaminas (Eicher y cols, 1997). También existen referencias en humanos que describen interacciones nutriente-nutriente. Así, la ingesta simultánea de vitaminas A y E en grandes cantidades modifica la absorción de vitamina A incrementándola (Biesalski, 1997). Por otra parte, hay estudios en donde se valora la absorción del calcio en presencia de vitamina A, vitamina D o las dos, y la ingesta conjunta de vitaminas A y D da como resultado una absorción de menor calcio (Johansson & Melhus, 2001).

1.3.3.2 Factores asociados al sujeto.

En el acrónimo SLAMA(E)NGHI, se reflejan tres factores asociados al sujeto; el estatus Nutricional del sujeto, los factores Genéticos y otros factores relacionados con el Huésped. En la absorción de nutrientes, no sólo influye el estado nutricional y diversas patologías, sino también ciertos polimorfismos genéticos que se asocian con diferentes respuestas en metabolismo lipídico postprandial (Agren y cols. 1998; Pérez-Martínez y cols, 2004). Así por ejemplo, estos autores describen que la variabilidad alélica en el gen SR-BI podría explicar las diferencias interindividuales de respuesta lipémica postprandial en personas sanas (Pérez-Martínez y cols, 2004).

En cuanto a los *factores asociados con el Huésped* (H) (ej. parásitos en el tracto gastrointestinal), la presencia de infecciones puede provocar alteraciones en la morfología de la mucosa intestinal y esto conlleva la disminución de la absorción de micronutrientes liposolubles (Jalal y cols, 1998). Respecto al *consumo de alcohol*, hay estudios que indican que las personas que consumen habitualmente grandes cantidades de alcohol suelen comer dietas con menor contenido de vitaminas que aquellos que no beben y sin embargo tienen niveles de retinol en suero mayores que los no bebedores (Van den Berg, 2002). Los *fumadores* generalmente tienen niveles en sangre más bajos de antioxidantes, pero no en cuanto a la vitamina E. La mayoría de los estudios indican que no varían los niveles de α -tocoferol entre fumadores y no fumadores (Van den Berg y cols, 2002).

Otros factores asociados al sujeto que pueden influir en la biodisponibilidad de vitamina A y E son el *sexo* y la *edad*. Hay estudios de biodisponibilidad de vitaminas A y E durante el metabolismo postprandial con jóvenes (20-29 años) y personas mayores (60-69

años) que indican que no existen diferencias en cuanto a la respuesta del palmitato de retinilo en quilomicrones expresada como AUC (Borel y cols, 1998) aunque la respuesta de α -tocoferol en quilomicrones puede ser mayor en el grupo de los jóvenes que en el grupo de mayores (Borel y cols, 1997). Por otro lado, las mujeres tienden a alcanzar concentraciones de ésteres de retinilo en periodo post-absortivo más bajos que los hombres, que podría deberse al efecto de las hormonas femeninas en el metabolismo lipídico postprandial (Biesalski, 1997).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La leche es un alimento con un alto valor nutritivo y constituye una fuente importante de nutrientes, tanto macro como micronutrientes. Su composición ha sido objeto de gran número de modificaciones por la industria láctea (ej mediante la reducción, aumento o adición de algún nutriente) con objeto de aportar un valor añadido a este alimento básico, lo cual puede ser de gran interés para algunos grupos de población o para sujetos en determinadas circunstancias o etapas de la vida.

OBJETIVOS:

1. Determinar de forma individualizada el contenido en vitamina A (retinol libre, y/o en formas éster), carotenoides (con actividad provitamínica A) y vitamina E (α , γ , δ -tocoferol, y/o formas éster) en leche enriquecida en vitaminas A y E (entera, semidesnatada y desnatada) de frecuente consumo en el mercado español.

2. Evaluar la biodisponibilidad (absorción relativa) de las vitaminas A y E en sujetos aparentemente sanos a partir de leche entera y enriquecida con estas vitaminas, considerando algunos factores que influyen en la absorción de estos compuestos (*cantidad ingerida*, *forma química* de las vitaminas presentes en el alimento (naturales o añadidas) y *porcentaje de grasa*).

2.1. Comparar la respuesta obtenida en suero y en la fracción de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) durante el periodo post-prandial.

2.2. Evaluar la concordancia e intercambiabilidad de distintos métodos de cálculo para la valoración de la absorción relativa de vitamina A.

MATERIAL Y SUJETOS

3. MATERIAL Y SUJETOS

3.1. Equipo cromatográfico.

Cromatógrafo ALC (modelo 201, Waters Assoc., Milford, MA, USA) equipado con dos bombas (modelos 6000A y M-45) e inyector manual (modelo Reodhyne). Para la detección se utilizaron detectores UV/VIS; uno multicanal programable en tiempo y longitudes de onda (modelo 490E) y un detector de red de diodos (PDA 996) (Waters Assoc., Milford, MA, USA). La información de los detectores se registró en un sistema de adquisición de datos Millenium (versión 2010, Waters Assoc., Milford, MA, USA).

3.2. Aparataje y material de laboratorio.

El aparataje empleado en este estudio consistió en un agitador termostático (Intester), balanzas (modelos P-1200, Merttles y Sartorius), baño de ultrasonidos (Selecta), centrifugas (Centronise (Sigma) y Biofuge A (Heraeus)) y espectrofotómetro de doble haz Uvikon 930 (Kontron).

Para la recogida de muestras de sangre se ha utilizado el material de clínica básico y para las determinaciones de vitaminas A, E y carotenoides en los distintos tipos de muestra (leche, suero y fracción de lipoproteínas rica en triglicéridos contenida en plasma) se ha utilizado material básico de laboratorio así como otro más específico como pipetas automáticas (transferpette® 100-1000µl; Brand, Germany), filtros de jeringa Millex-FH

0,45 μ m (Millipore Corporation Bedford, USA), filtros para fase móvil Millex-FH 0.5 μ m (Millipore Corporation Bedford, USA) y nitrógeno N50 (Alpha gaz).

3.3. Reactivos y Patrones.

Butil-hidroxi-tolueno (BHT), hidróxido potásico (OHK), ácido pirogálico, tetrahidrofurano (THF), isopropanol y agua (grado HPLC) fueron adquiridos a Carlo Erba (España). Etanol, hexano, acetonitrilo, metanol y diclorometano (grado HPLC) y cloruro sódico fueron suministrados por Merck (España) y el acetato de amonio fue adquirido a Sigma (España).

All-trans-retinol, acetato de retinilo, palmitato de retinilo, α -tocoferol, γ -tocoferol, acetato de tocoferilo, β -caroteno, α -caroteno, licopeno y luteína fueron adquiridos a Sigma (España). Zeaxantina y β -criptoxantina fueron proporcionados por DSM, anteriormente Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland).

3.4. Leche.

Los análisis se realizaron sobre leche comercialmente disponible (envasada en tetrabrik) perteneciente a 5 marcas (Pascual, Central Lechera Asturiana, Lauki, Puleva, Sveltesse), cuya selección se realizó según cuotas de mercado a partir de información proporcionada por la Federación Nacional de Industrias Lácteas (1998). Las marcas analizadas representaban un 50% de la cuota de mercado de leche líquida. Los análisis se realizaron mes y medio antes de la fecha de caducidad indicada en cada envase. El contenido de vitaminas A y E de estos productos especificado en su etiquetado nutricional se muestra de

dos formas, bien indicando el aporte de vitaminas A y E por ración de 250ml como porcentaje de la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) o bien, informando que 100ml del producto aporta la cantidad de vitaminas A y E que cubre el 15 % de las CDR.

En el estudio de biodisponibilidad se ensayaron tres tipos de leche (leche entera, leche desnatada enriquecida con vitaminas A y E y entera enriquecida con vitaminas A y E). Debido a la ausencia en el mercado de leches enriquecidas únicamente con vitaminas A y E, se utilizaron leches que también estaban enriquecidas con vitamina D y ácido fólico, Ca y P, pertenecientes a una única marca comercial (Pascual), elegida porque comercializa los tres tipos de leche a evaluar y su cuota de participación en el mercado se encontraba entre las cinco primeras marcas. La elección de estos tres tipos de leche se realizó teniendo en cuenta el tipo de matriz (leche líquida), porcentaje de grasa (producto entero o desnatado) y la forma química de las vitaminas presentes en el alimento (naturales o añadidas). Debido a cuestiones logísticas (descanso entre ensayos, disponibilidad del personal de enfermería, aislamiento y preparación de las muestras,...), el estudio se realizó en dos épocas diferentes del año (enero y mayo) lo que condicionó que se emplearan diferentes lotes y envases.

3.5. Sujetos.

La elección de los participantes en el estudio se realizó mediante muestreo no probabilístico (voluntarios), seleccionados a partir de estudiantes de la Escuela Universitaria de Enfermería del Hospital Universitario Puerta de Hierro (HUPH), familiares y conocidos del personal del Hospital Universitario Puerta de Hierro (HUPH).

La inclusión de sujetos en el ensayo se realizó mediante entrevista personal en la que se informó con detalle del estudio (anexo I). Se recabó información sobre datos personales, antropométricos (peso y talla) y hábitos de consumo de alimentos (p.ej. aversión a alimentos, dietas monótonas o de adelgazamiento) (anexo II). Tras la entrevista, se recogió una muestra de sangre en ayunas para evaluar parámetros bioquímicos y hematológicos (analítica de inclusión).

Los criterios de inclusión fueron; edad de 20-31 años, índice de masa corporal (IMC) entre 20-25 kg/m², estatus nutricional de vitaminas A y E adecuados (retinol sérico > 1.05 µmol/L (30µg/dl) y α- tocoferol > 16 µmol/L (700µg/dl)) (Underwood, 1984; Morrissey y cols, 1993) y parámetros generales de bioquímica y hematología dentro los rangos de referencia establecidos en el HUPH. Se consideraron criterios de exclusión el embarazo, infección, enfermedad crónica o aguda, seguimiento de dietas especiales o de adelgazamiento, uso habitual de fármacos, productos de herbolario, suplementos vitamínicos y utilización de anticonceptivos orales.

Un total de 21 sujetos fueron informados de los cuales 2 fueron excluidos por enfermedad quedando 19 sujetos incluidos en el estudio (9 hombres y 10 mujeres). Las características de los sujetos a la entrada del estudio se muestran en las tablas 1 y 2.

MÉTODOLÓGÍA

4. MÉTODOLÓGÍA

4.1 Método cromatográfico.

El análisis cromatográfico se basó en el método utilizado para la determinación en suero de vitaminas A, E y carotenoides descrito por Granado y cols, (1991). El sistema incluye columna polimérica Spheri- 5 ODS (C18, 5 μm ; 220mm. x 4,6 mm), y pre-columna RP-18 (7 μm ; 15mm x 3,2 mm.) (Brownlee Columns, Applied Biosystems, CA). Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo/diclorometano/metanol (70:20:10 v/v/v), con elución isocrática a flujo 1,3 ml/min. El tiempo total de análisis es de 13 minutos y permite la separación simultánea de retinol, acetato de retinilo, palmitato de retinilo, α - y γ -tocoferol, acetato de tocoferilo, β -criptoxantina, β -caroteno (*trans*, *cis*) además de otros ésteres de retinilo de cadena larga en diferentes matrices lácteas, según ha sido descrito anteriormente (Olmedilla y cols, 1992).

4.1.1. Detección e identificación.

Los compuestos de interés se detectaron en el rango ultravioleta-visible (retinoides: $\lambda=325\text{nm}$; tocoferoles $\lambda=295$ y carotenoides: $\lambda=450\text{nm}$). Las distintas formas químicas de vitaminas A, E y carotenoides fueron identificadas comparando sus tiempos de retención y espectros de absorción con los de sustancias patrón, conforme a los datos indicados en la tabla 5. Bajo las condiciones analíticas utilizadas en los distintos tipos de muestra (leche, suero y TRL), los límites de detección para los retinoides (retinol, acetato y palmitato de retinilo)

fueron < 0,2 ng inyectados, para los tocoferoles (α , γ -tocoferol y acetato de tocoferilo) 0,5-12,3 ng inyectados y para carotenoides (β -caroteno y β -criptoxantina) 0,6-1,0 ng inyectados.

4.1.2. Curvas de calibrado y cuantificación.

Las soluciones patrón de cada analito se prepararon disolviendo de 1-50 mg/100 ml, en etanol, éter de petróleo o tetrahidrofurano, las cuales se almacenaron protegidas de la luz a -20 °C bajo atmósfera de nitrógeno. Las soluciones patrón se midieron periódicamente con espectrofotómetro de doble haz y las concentraciones se calcularon corrigiendo las medidas gravimétricas sobre la base de los valores de absortividad ($E^{1\%}_{1cm}$) (tabla 5) así como tras inyección individual de los patrones en el HPLC para su corrección por presencia de isómeros y/o otros picos presentes en el cromatograma.

Las curvas de calibrado se prepararon a partir de las disoluciones de los patrones y los rangos de concentración se adecuaron a las cantidades encontradas en los distintos tipos de muestra (leche, suero y fracción de lipoproteínas rica en triglicéridos). El método cromatográfico mostró una buena linearidad en los rangos de concentraciones ensayados, con coeficientes de correlación entre el área de cada pico y la concentración correspondiente del compuesto > 0.995.

A partir de 1ml de leche, suero o fracción de lipoproteínas ricas en triglicéridos contenidas en 1 ml de plasma, atendiendo a los protocolos de preparación de las muestras, las cantidades mínimas cuantificadas fueron: retinol y palmitato de retinilo (0,2-1 μ g/100ml), acetato de retinilo (<1 μ g/100ml), α -tocoferol (5-10 μ g/100ml), γ -tocoferol (0,5-1 μ g/100ml),

acetato de tocoferilo ($<10\mu\text{g}/100\text{ml}$), β -criptoxantina y β -caroteno ($1\text{-}3\mu\text{g}/100\text{ml}$) (Herrero, 2003; Herrero-Barbudo y cols, 2005; Herrero-Barbudo y cols, 2006).

4.2. Análisis de vitaminas A, E y carotenoides en leche entera y enriquecidas con vitaminas.

Para la determinación de vitaminas A, E y carotenoides en leche entera y enriquecida, se utilizaron simultáneamente dos protocolos (Herrero, 2003):

a) Extracción con solventes orgánicos para determinar las formas químicas de las vitaminas (libres y ésteres) presentes en los tres tipos de leche.

b) Hidrólisis alcalina directa de la matriz láctea y posterior extracción para obtener el contenido total de retinol y α -tocoferol.

4.2.1. Determinación de formas químicas individualizadas.

Para determinar el contenido individualizado de vitaminas A, E y carotenoides en leche, se voltea varias veces el tetrabrik para favorecer la homogenización de la muestra. Se toman 200 ml de leche y se calienta en una placa con agitación magnética hasta que alcancen los 85°C . Se toma 1ml de leche (por cuadruplicado) al que se añade 0,1ml β -criptoxantina (estándar interno) solubilizada en etanol (ETOH) y 0,9ml de ETOH. Se agita en vortex durante 80 segundos, se añaden 2ml de hexano (BHT al 0,01%) / diclorometano (5:1 v/v) y se pone en baño ultrasonido durante 5 minutos con vortex intermitente. Posteriormente, se

centrifuga a 3000 r.p.m. (630g) y se recoge la fase orgánica. El proceso de extracción se repite, los sobrenadantes se juntan y las fases orgánicas se evaporan bajo atmósfera de nitrógeno. Los extractos son reconstituidos (0,3 ml) con tetrahidrofurano (THF (0,01% BHT) / ETOH) (1:1 v/v), se filtran (FH 0.45 μ l) y se inyectan en el cromatógrafo (7, 5 μ l).

El porcentaje de recuperación de analitos durante el proceso de extracción se determinó mediante la adición de palmitato de retinilo y α -tocoferol a la muestra. En leche entera, el porcentaje de recuperación durante el proceso de extracción fue superior al 80% para ambos analitos añadidos.

4.2.2. Determinación del contenido total.

Para determinar el contenido total de vitaminas A, E y carotenoides en leche, sobre 0,5ml de leche fría (4-7°C) (por cuadruplicado) se añaden 0,1ml de β -criptoxantina en etanol y 0,5ml de ácido pirogálico (utilizado como antioxidante) 0,3 M en etanol. A continuación se agita en vortex durante 1 minuto y se añade OHK en metanol (concentración final 13%). Los tubos se ponen en baño ultrasonido con vortex intermitente durante 15 minutos donde la leche alcanza una temperatura máxima entre 40-45°C. Posteriormente la extracción se realiza con 1ml de agua con cloruro sódico ClNa (5%), 0,5ml de isopropanol y 2ml de Hex/DCM 5:1 (v/v), con vortex 30 segundos y 5 minutos en centrifuga a 3000 r.p.m (630 g). Se recoge la fase orgánica y el proceso se repite dos veces. Los extractos orgánicos se juntan y se lavan con agua (Milli-Q) para eliminar los restos de OHK ($\text{pH} \leq 7$). Los extractos lavados se evaporan bajo atmósfera de nitrógeno, se reconstituyen (0,15ml) con tetrahidrofurano (THF

0,01% BHT) / ETOH (1:1 v/v), se filtran (FH 0,45 μ m) y se inyectan en el cromatógrafo (7, 5 μ l).

La eficacia del proceso de saponificación y el porcentaje de recuperación de compuestos a analizar se realizó utilizando patrones (palmitato de retinilo, acetato de tocoferilo y α -tocoferol) sometidos a las mismas condiciones de saponificación. Las condiciones establecidas mostraron una eficacia de hidrólisis del 100% evaluada como la ausencia total de formas éster en el cromatograma.

En la leche entera, el porcentaje de recuperación resultado de comparar la cantidad de palmitato de retinilo presente en el alimento (tras el proceso de extracción) y la de retinol libre obtenida de la misma matriz tras el proceso de saponificación directa del alimento, fue del 102% (Herrero, 2003). En cuanto al α -tocoferol (analito presente en las muestras de leche entera y no saponificable) el porcentaje de recuperación se evaluó con el patrón sometido a las mismas condiciones de saponificación y se obtuvo una recuperación del 98%.

En la leche enriquecida, la eficacia de hidrólisis del acetato de retinilo y acetato de tocoferilo (analitos añadidos) fue > 95% y los porcentajes de recuperación calculados sobre una base estequiométrica (retinol y α -tocoferol recuperados) fueron >95% (Herrero-Barbudo y cols, 2005).

4.3. Análisis de vitaminas A, E y carotenoides en suero y en la fracción de lipoproteínas rica en triglicéridos (TRL).

La sangre recogida en tubos con EDTA (7,5%) se centrifuga a 2000 r.p.m. (280g) durante 20 minutos, se separa el plasma y se congela a -20°C hasta el momento del análisis

(< 9 meses). Bajo las condiciones indicadas, los compuestos a analizar son estables hasta 2 años para la vitamina A y 1 año para la vitamina E, tanto en suero como en plasma (Driskell y cols, 1985; Comstock y cols, 1993, WHO, 2002).

4.3.1. Aislamiento de TRL.

El aislamiento de la fracción de lipoproteínas rica en triglicéridos se llevó a cabo según lo descrito por Griffiths y cols, (1994). Brevemente, sobre 0,5 ml de plasma (por duplicado) se añade 0,8 ml de cloruro sódico (densidad 1,006 Kg L⁻¹) y se centrifugan a 11723 r.p.m. (12.600 g) durante dos horas a temperatura ambiente. Se recoge el sobrenadante que contiene la fracción de lipoproteínas rica en triglicéridos y los duplicados de cada tiempo, se trasvasan a un tubo para realizar la extracción del retinol (libre y en forma éster), tocoferol libre y carotenoides.

4.3.2. Extracción de vitaminas A, E y carotenoides en suero y en la fracción de lipoproteínas rica en triglicéridos.

El análisis de vitaminas A, E y carotenoides en suero y en TRL, se realizó conforme a la metodología descrita por Olmedilla y cols, (1997). Brevemente, las muestras de sangre se centrifugan a 3000 r.p.m. (630 g) durante 5 minutos, se recoge el suero y se almacena a - 20 °C hasta el análisis (< 3 meses). Sobre 0,5-1 ml de suero o fracción de lipoproteínas ricas en triglicéridos se añade la misma cantidad (0,5-1 ml) de etanol, se agita en vortex durante 45 segundos, y se hace doble extracción con 2 ml de hexano/diclorometano (5:1 v/v)

estabilizado con BHT (0.01%) agitando en vortex 3 y 2 minutos, respectivamente. Se separan las fases orgánicas, se juntan, se evaporan bajo atmósfera de nitrógeno, se reconstituyen con 0,05-0,1 ml de tetrahidrofurano/etanol (1:1 v/v) y se inyectan 7,5µl.

4.4. Estudio de biodisponibilidad.

Para evaluar la absorción relativa de vitaminas A, E y carotenoides provitamínicos A a partir de leche entera y enriquecida con vitaminas (con distintos porcentajes de grasa) se realizó un estudio de biodisponibilidad a dosis única. El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Vitaminas del Hospital Universitario Puerta de Hierro (HUPH).

El esquema temporal del estudio de biodisponibilidad se muestra en la figura 1. Para minimizar interferencias debidas a ingestas anteriores de los nutrientes de interés, a los participantes se les pidió que siguieran una dieta baja o exenta de retinol y carotenoides provitamínicos A durante las 24 horas previas al ensayo. Para ello se les entregó información con pautas de alimentos que debían evitarse y otros que podían comer. Asimismo a los participantes se les pidió un registro de los alimentos ingeridos durante las 24 horas previas a cada ensayo (anexos IV y V).

El día del ensayo, los sujetos acudieron a la Unidad de Vitaminas del Hospital Universitario Puerta de Hierro (en grupos de 6 sujetos) en ayunas de al menos de 8 horas, se les tomó una vía y se les realizó una extracción de sangre (muestra basal). A continuación se les dio un desayuno estándar común a los tres ensayos que consistió en 430ml de leche con 10 galletas. El contenido nutricional del desayuno con los componentes mayoritarios de interés en el estudio, se muestra en la tabla 3.

Una vez ingerido el desayuno, se tomaron muestras de sangre hora y media después y posteriormente cada hora durante 5 horas. Estos tiempos se establecieron en base a los estudios de metabolismo post-prandial de vitaminas liposolubles o carotenoides descritos en la bibliografía (Van Vliet y cols, 1995; O'Neill y Thurnham, 1998; Granado y cols, 1998) y con los datos de una prueba piloto realizada a partir de leche entera enriquecida en vitaminas A y E en uno de los participantes.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos, con y sin EDTA, con lo que se obtuvo suero y plasma (en cada tiempo) que se almacenó a - 20°C hasta su posterior procesamiento. Cada ensayo tenía una duración total de 7 horas, durante el cual los sujetos no tomaron ningún alimento excepto agua. El volumen de sangre extraído en cada ensayo fue menor de 70 ml y se estableció un periodo de descanso de 7 días entre los distintos tipos de leche.

El presente estudio formó parte del proyecto de investigación financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, 98/0386) y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta de Hierro. Todos los participantes fueron informados y dieron su consentimiento por escrito (anexo III).

4.5. Cálculo de la absorción relativa de vitaminas A y E durante el periodo postprandial.

4.5.1. Concentración de ésteres de retinilo totales y α -tocoferol a lo largo del tiempo. Área bajo la curva (AUC).

El área bajo la curva se calculó teniendo en cuenta la concentraciones de los analitos (ésteres de retinilo totales y α -tocoferol) (corregido por el valor basal) a lo largo del tiempo (7 h del periodo postprandial). Este cálculo se realizó mediante la suma de áreas (método trapezoidal) con el programa informático PK cal (Merrel Dow Research Institute). Éste área se calculó teniendo en cuenta todos los tiempos del periodo postprandial (basal, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 y 6.5h) y tomando sólo 3 tiempos (basal, 3.5 y 6.5h), correspondiendo a las áreas bajo la curva convencional y predictora, respectivamente (Guerci y cols, 2001). La elección del tiempo intermedio se realizó en base al tiempo en el que se alcanza la concentración máxima de palmitato de retinilo durante el periodo posprandial tras la ingesta de vitamina A (procedente de cápsulas o alimentos) (Borel y cols, 1998; Renuka y cols, 2001).

4.5.2. Porcentaje de absorción relativa frente a cantidad ingerida.

El cálculo de absorción relativa se realizó en base a las concentraciones de vitamina A (ésteres de retinilo totales) y vitamina E (α -tocoferol) determinados en suero y TRL durante el periodo postprandial expresadas de forma global como valor de analito absorbido en las 6,5 horas (AUC convencional con 7 tiempos) y predictora (AUC con 3 tiempos)). El valor del

área se ajustó teniendo en cuenta el volumen plasmático de cada sujeto, el 4% del peso corporal (Geigy, 1962), y la absorción se expresó como porcentaje frente a la cantidad de vitaminas A y E suministradas con los distintos tipos de leche.

Otro método empleado para la estimación de la absorción de vitamina A ha sido la utilización exclusivamente del valor de concentración máxima de vitamina A (ésteres de retinilo totales) alcanzado en suero y TRL, según lo descrito para carotenoides anteriormente (Barua, 1999).

4.6. Control de calidad

4.6.1. Determinaciones en leche.

La calidad del método de análisis empleado en la determinación de vitaminas A, E y carotenoides en las muestras de leche se evaluó con dos materiales de referencia disponibles en el mercado, aplicables al presente estudio y similares en cuanto a naturaleza y composición (tabla 4).

*.- Standard Reference Material (SRM-1846) “Infant Formula” (National Institute of Standard Tecnology, NIST, USA) con valores de referencia certificados sobre contenido de vitamina A y vitamina E.

*.- Control Reference Material (CRM-421) “Whole Milk Powder” (Laboratory of the Government Chemist, Teddington, UK) que ofrecía valores informativos sobre vitamina A y vitamina E.

4.6.2. Determinaciones en suero.

La calidad del método de análisis empleado en la determinación de vitaminas A, E y carotenoides en suero se evalúa mediante la participación periódica en el “Fat-soluble vitamin Quality Assurance Programme”, programa dirigido por el National Institute of Standards and Technology (NIST, USA).

4.7. Análisis estadístico

Hipótesis nula: El porcentaje de absorción relativa ajustada por la cantidad de vitaminas A y E ingerida, es igual a partir de los tres tipos de leche (entera, desnatada enriquecida y entera enriquecida).

Las características basales de los sujetos y el contenido de vitaminas A y E en leche, TRL y suero se expresaron como la media \pm desviación estándar. La distribución normal de los datos se valoró mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y las diferencias entre sujetos al inicio del estudio evaluaron mediante el test t de Student. Excepto para los niveles de retinol en suero, no hubo diferencias significativas entre hombres y mujeres a la entrada del estudio.

Para valorar la respuesta post-prandial (esteres de retinilo y α -tocoferol en TRL y suero), se calculó el área de concentraciones frente al tiempo (AUC) mediante el método trapezoidal una vez corregidas por los niveles basales. No se observaron diferencias entre sexos respecto al AUC para los tres tipos de leche (ANOVA) y, por tanto, hombres y mujeres fueron evaluados conjuntamente en posteriores análisis estadísticos. Para evaluar diferencias entre grupos en los niveles de α -tocoferol y ésteres de retinilo durante el periodo post-

prandial, en TRL y suero, tras la ingestión de los tres tipos de leche utilizó el test t para muestras pareadas.

Los porcentajes de absorción relativa durante el periodo de estudio (6.5 h) se calcularon sobre la base de los valores de AUC para ésteres de retinilo totales y α -tocoferol en TRL y suero, ajustando por el volumen plasmático (asumiendo 4% del peso corporal) (Geigy, 1962) y expresado frente a la cantidad de vitaminas suministrada con cada tipo de leche, según los análisis realizados por HPLC en nuestro laboratorio.

Debido a las discrepancias entre el contenido de vitaminas en las leches utilizadas en los ensayos según nuestros análisis (datos contrastados con materiales de referencia) y aquellas descritas en las etiquetas del producto, el porcentaje de absorción relativa se calculó utilizando la cantidad total de vitaminas determinada en nuestro laboratorio.

Para comparar y evaluar la intercambialbilidad de los distintos métodos de cálculo utilizados en la estimación del AUC y de la absorción relativa se realizaron estudios de correlación (Pearson) así como modelos de regresión lineal. El análisis de concordancia entre ambas medidas (AUC convencional y AUC predictivo) se evaluó mediante el método de Bland y Altman (1986). Se define el límite de confianza del mismo modo que el intervalo de confianza del 95% de la diferencia entre las áreas, y mide la dispersión en la población. El límite de concordancia se define como los valores obtenidos de la suma de dos desviaciones típicas alrededor de la diferencia anterior y mide la dispersión en la muestra. También se realizaron estudios de correlación entre los porcentajes de absorción de vitamina A entre sujetos para los distintos tipos de leche (Spearman).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS versiones 8.0, 9.0 y 13.0 y el nivel de significación se estableció en $p < 0.05$.

Tabla 1. Características de los voluntarios (n=19, 9 hombres y 10 mujeres) a la entrada del estudio¹.

	Media \pm SD	Rango (hombres y mujeres)
Edad (años).		(20 - 31)
Hombres	22 \pm 2	
Mujeres	23 \pm 4	
Peso (Kg).		(55,2 - 92,2)
Hombres	75,7 \pm 10,3	
Mujeres	59,7 \pm 4,6	
Talla (m).		(1,52 - 1,91)
Hombres	1,80 \pm 0,1	
Mujeres	1,67 \pm 0,1	
Índice de Masa Corporal (IMC, Kg/m²)		(19,8 - 25,3)
Hombres	23,2 \pm 2,3	
Mujeres	21,6 \pm 1,3	
Superficie corporal (m²)		(1,3 - 2,2)
Hombres	1,9 \pm 0,2	
Mujeres	1,5 \pm 0,18	
Volumen plasmático (L)		(2,2 - 3,69)
Hombres	3,03 \pm 0,4	
Mujeres	2,39 \pm 0,2	

	Media \pm SD	Rango (hombres y mujeres)
Colesterol (mg/100mL)		(124 - 237)
Hombres	171,7 \pm 30,8	
Mujeres	170,3 \pm 32,3	
Colesterol HDL (mg/100mL)		(37 - 99)
Hombres	54,4 \pm 18,7	
Mujeres	39,6 \pm 9,3	
Colesterol LDL (mg/100mL)		(66 - 179)
Hombres	102,1 \pm 27,9	
Mujeres	99,8 \pm 32,1	
Triglicéridos (mg/100mL)		(14 - 193)
Hombres	74,3 \pm 51,2	
Mujeres	52,1 \pm 25,2	
Hierro (mg/100mL)		(45 - 163)
Hombres	100,3 \pm 45,1	
Mujeres	86,1 \pm 26,1	
Hemoglobina (g/100mL)		(12,5 - 17)
Hombres	15,9 \pm 0,8	
Mujeres	14,0 \pm 0,9	
Fumadores		
Hombres	44%	
Mujeres	30%	

¹ Niveles significativamente distintos sólo para retinol (test t de Student).

Tabla 2. Niveles de vitaminas A, E de los voluntarios (n=19, 9 hombres y 10 mujeres) a la entrada del estudio.

	Media \pm SD	Mediana y rango	Intervalos de referencia ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)
Retinol ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)		44,2 (29,9 – 69,8)	(28,9- 75,3) ^a
Hombres	51,8 \pm 9,8		
Mujeres	39,6 \pm 9,3		
α-tocoferol (mg/100mL)		1050 (850 - 1350)	(760,2 - 1979,9) ^a
Hombres	1029,6 \pm 200		
Mujeres	1019,6 \pm 102		
α-tocoferol/colesterol		6,1 (4,3 - 7,3)	(3,8- 7,6) ^a
Hombres	6,0 \pm 0,7		
Mujeres	6,1 \pm 0,9		
γ- tocoferol ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)		34,6 (22,6 - 85,4)	(22,9-88,8) ^b
Hombres	33,8 \pm 7,5		
Mujeres	42,0 \pm 20,7		

^a Valores de referencia en población española: (5th- 95th) (Olmedilla y cols, 1997)

^b Valores de referencia en población española: (10th- 90th) (Granado y cols, 1998)

Tabla 3. Valor nutricional del desayuno^a.

	Ensayo BD-1 Leche entera enriquecida en vitaminas A y E	Ensayo BD-2 Leche entera	Ensayo BD-3 Leche desnatada enriquecida vitaminas A y E
Grasa total (g)	20,8	20,8	6,2
Energía total (Kcal)	565,7	535,6	436,7
Vitamina A (retinol, mg)	516	n.i.	516
Vitamina E (α-tocoferol, mg)	6450	n.i.	6450

^a 430 ml de leche más 10 galletas. Información obtenida a partir de las etiquetas de información nutricional.

n.i. Valor no indicado en la etiqueta de información nutricional

Tabla 4. Contenido de vitaminas A y E en los Materiales de Referencia (preparados lácteos pulverizados). Valores expresados en masa seca.

MATERIAL DE REFERENCIA	% GRASA	FORMAS QUÍMICAS	VITAMINA A μg retinol/100g	VITAMINA E μg α-tocoferol/100g
⁽¹⁾ SRM-1846 “Infant Formula”	27,1 \pm 0.6	- Palmitato de retinilo. - Acetato de tocoferilo.	584 \pm 68	27100 \pm 2500
⁽²⁾ CRM-421 “Whole milk powder”	26,9 \pm 0.3	-Acetato de retinilo. -Palmitato de retinilo - α -tocoferol	270 \pm 30	600 \pm 100

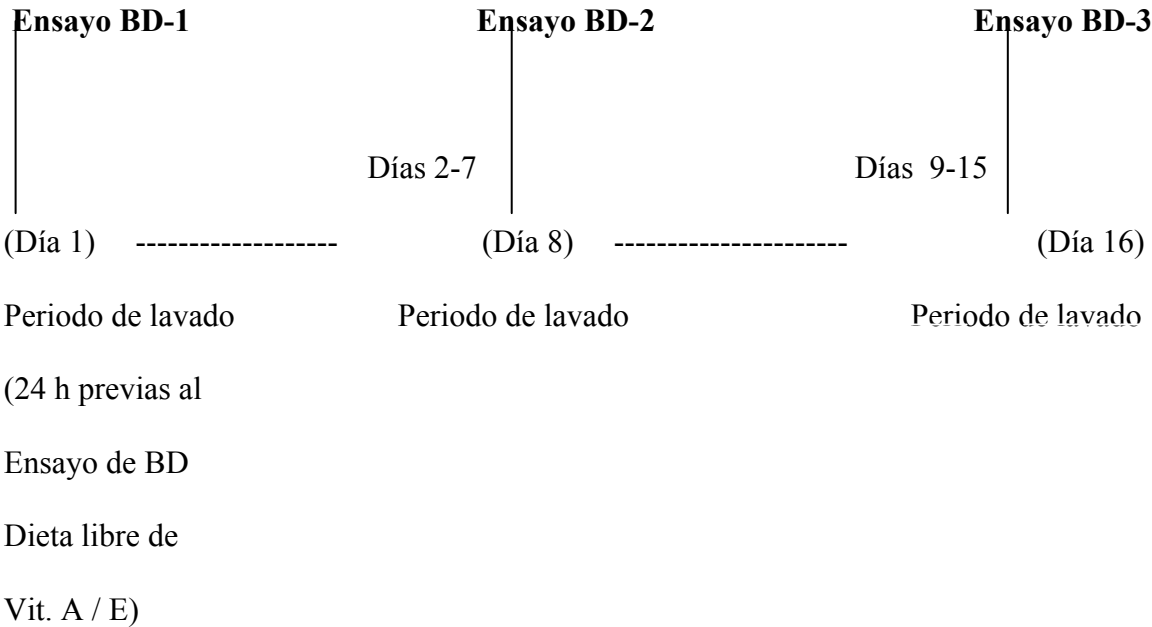
(1) Valores de referencia certificados. NIST, USA.

(2) Valores de referencia informativos. LGC, UK.

Tabla 5. Valores utilizados para la corrección espectrofotométrica de retinoides, tocoferoles y carotenoides.

Compuesto	Solvente	λ (nm)	$E^{1\%}_{1cm}$	Ref.
Retinol	Etanol	325	1843	NIST, 1998.
Acetato de retinilo	Etanol	326	1550	Merck Index, 1983.
Palmitato de retinilo	Etanol	328	975	Merck Index, 1983.
α -tocoferol	Etanol	292	72	Machlin, 1984.
γ -tocoferol	Etanol	297	91	Machlin, 1984.
Acetato de tocoferol	Etanol	285	42	Machlin, 1984.
β -criptoxantina	Éter de Petróleo	452	2386	De Ritter y Purcell, 1981.
β -caroteno	Éter de Petróleo	453	2592	De Ritter y Purcell, 1981.

Figura 1. Esquema temporal de los ensayos en el estudio de biodisponibilidad (BD).



Ensayo BD-1: Leche Entera enriquecida en vitaminas A y E.

Ensayo BD-2: Leche Entera

Ensayo BD-3: Leche Desnatada enriquecida en vitaminas A y E.

RESULTADOS

5.- RESULTADOS

5.1. Análisis de vitaminas A, E y carotenoides en leche (entera, semidesnatada y desnatada) enriquecida en vitaminas A y E .

5.1.1 Formas químicas individualizadas de vitaminas A y E.

La vitamina A en leche entera se encuentra presente en forma de éster, mayoritariamente palmitato de retinilo, así como otros ésteres de retinilo de cadena larga presentes en menor proporción, los cuales fueron identificados por su comportamiento cromatográfico (tiempo de retención), espectro de absorción y su ausencia tras la saponificación. También está presente β -caroteno (*trans* y *cis*) carotenoide provitamínico A, en cantidades muy pequeñas. En la leche enriquecida con vitamina A, ésta se encuentra como acetato de retinilo, forma química utilizada comercialmente para enriquecer los alimentos.

La vitamina E en la leche entera se encuentra como α -tocoferol libre, mientras que en los productos enriquecidos con esta vitamina, se encuentra en forma de éster (acetato de tocoferilo). No se detecta la presencia de β -, γ -, ni δ -tocoferol. En la figura 2, se muestran los cromatogramas a distintas longitudes de onda correspondientes a los extractos de los tres tipos de leche (entera y enriquecidas).

5.1.2. Contenido total de vitaminas A, E y carotenoides.

El contenido total de vitaminas A, E y β -caroteno en los distintos tipos de leche enriquecida se muestra en la tabla 6 y corresponde a las determinaciones realizadas tras el proceso de extracción tras hidrólisis alcalina previa. En la leche entera enriquecida (2 marcas), el valor promedio del retinol es de $5,9 \pm 0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ con un coeficiente de variación (CV) del 14 % y para el α -tocoferol, el valor promedio es $39,3 \pm 11,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ con un CV del 29%. En la leche semidesnatada enriquecida (3 marcas), el valor promedio del retinol es de $6,1 \pm 2,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ con un CV del 34 % y de α -tocoferol es $25,6 \pm 24,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ con un CV del 95%. En el caso de la leche desnatada enriquecida (3 marcas), el valor promedio de retinol es $4,1 \pm 1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ con un CV de 28%, y el de tocoferol es $40,9 \pm 9,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ con un CV de 22 %.

Los resultados obtenidos mediante análisis por HPLC muestran diferencias (tanto por exceso como por defecto) frente al valor referenciado en la etiqueta nutricional (ver tabla 6).

5.1.2.1. Variabilidad entre envases del mismo lote.

La variabilidad de contenido se evaluó en 2 envases del mismo lote en cada marca. La variabilidad de retinol en los distintos tipos de leche enriquecida fue $< 5\%$ en la leche entera enriquecida (1 marca), $< 12\%$ en la leche semidesnatada enriquecida (3 marcas) y $< 6\%$ para la desnatada enriquecida (2 marcas). Para el α -tocoferol la variabilidad entre envases del mismo lote fue $< 11\%$ en la leche entera enriquecida (1 marca), $< 20\%$ en la semidesnatada enriquecida (2 marcas) y $< 30\%$ en la desnatada enriquecida (2 marcas).

5.1.2.2. Variabilidad entre lotes de la misma marca.

En la leche entera (5 lotes), el valor promedio del retinol fue $1,46 \pm 0,35 \mu\text{mol L}^{-1}$ (CV 24 %) y de $1,9 \pm 0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ (CV, 33%) para el α -tocoferol. El promedio de retinol entre diferentes lotes a partir de leche entera enriquecida (4 lotes) fue de $7,4 \pm 1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ (CV 18%) y del $53,0 \pm 12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (CV, 23%) para el α -tocoferol. En la leche desnatada enriquecida (2 lotes), el valor promedio del retinol fue $3,3 \pm 0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ (CV, 25%) y de $45,1 \pm 12,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ (CV, 28%) para el α -tocoferol.

5.1.3. Control de calidad.

El método de análisis de las vitaminas y carotenoides empleado se evaluó sobre materiales de referencia, SRM 1846 (NIST) con valores certificados y CRM 421 (LCG) con valores orientativos (Herrero, 2003 y Herrero- Barbudo y cols. 2005). Utilizando el SRM 1846, el porcentaje de desviación respecto al valor certificado fue del -3,5% para el retinol y +1% para el α -tocoferol. En el caso de los valores "orientativos" del material CRM 421, sin embargo, los valores obtenidos estaban por debajo, siendo esta desviación de -9% para el retinol y -19% para el α -tocoferol (Herrero, 2003).

5.2. Estudio de biodisponibilidad en sujetos control.

5.2.1. Características basales de los sujetos en los ensayos.

Los niveles basales de vitaminas A y E en suero y en TRL, así como el perfil lipídico (colesterol total, y triglicéridos) al comienzo de cada ensayo se muestran en la tabla 7. No había diferencias significativas entre sujetos (hombres y mujeres) en los distintos parámetros evaluados, excepto para los niveles de retinol (test t-Student's, $p < 0,05$), resultado ya descrito por otros autores (Olmedilla y cols, 1994). Asimismo, según los registros de dieta recogidos durante las 24 horas previas a los ensayos, todos los voluntarios siguieron una dieta pobre o libre de retinol y carotenoides durante las horas previas a los distintos ensayos de biodisponibilidad por lo que el grado de cumplimiento de estas directrices fue del 100%.

5.2.2. Formas químicas presentes y cantidad de vitaminas A, E y β -caroteno ingeridas con los tres tipos de leche empleados en el estudio de biodisponibilidad.

Las formas químicas de vitaminas A y E presentes en los distintos tipos de leche se encuentran en los cromatogramas a distintas longitudes de onda recogidos en la figura 2. El contenido en vitaminas A, E y carotenoides así como el rango de las cantidades de vitaminas ingeridas por los voluntarios con cada tipo de leche se muestra en la tabla 8. Como se puede observar, el rango de ingesta con el mismo tipo de leche es muy amplio, hasta del doble en función de los distintos lotes empleados. El contenido en β -caroteno en los distintos tipos de

leche fue muy pequeño ($< 0,3 \pm 0,07 \mu\text{mol L}^{-1}$) por lo que no se tuvo en cuenta su contribución como vitamina A en el estudio de biodisponibilidad.

5.2.3. Absorción relativa de las vitaminas a partir de los tres tipos de leche.

Dado que no hubo diferencias en la respuesta (AUC) entre hombres y mujeres tras la ingesta de los distintos tipos de leche (ANOVA), los análisis subsiguientes se realizaron de forma conjunta.

5.2.3.1. Vitamina A.

5.2.3.1.1. Respuesta en la fracción de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL).

El análisis de las fracciones de lipoproteínas ricas en triglicéridos mostró la presencia de vitamina A en forma de éster, fundamentalmente como palmitato de retinilo, además de otros ésteres de cadena más larga en menor proporción, identificados por tiempo de retención y espectro de absorción. Estos ésteres de cadena más larga no se detectan en todos los tiempos del periodo postprandial, sino solo a partir de las dos horas tras la ingesta del desayuno, no en todos los sujetos, ni tras el consumo de los tres tipos de leche. Así, su presencia en TRL depende de la respuesta total; si la respuesta es mayor, además del palmitato de retinilo están presentes otros ésteres y si la respuesta es menor, solo aparece palmitato de retinilo.

La concentración máxima (suma total de ésteres de retinilo, $C_{\text{máx}}$) se alcanza entre las 2 y las 4 horas del periodo postprandial (tabla 9, figura 3). En la $C_{\text{máx}}$, el palmitato de retinilo supone el 75% del total de ésteres de retinilo, correspondiendo el resto a uno o dos ésteres de retinilo (dependiendo de la respuesta en cada sujeto) de cadena más larga.

Utilizando los valores medios de las $C_{\text{máx}}$ alcanzados tras la ingesta de los diferentes tipos de leche y se comparan los incrementos dos a dos, la leche entera enriquecida con vitaminas dio lugar a una respuesta de $31,7 \text{ nmol L}^{-1}$ (IC_{95%} 15,8 y 47,9; $p=0,001$) mayor que la leche entera, como se podría esperar dado que el aporte de retinol con la entera enriquecida era unas cuatro veces mayor que con la leche entera (ver tabla 9). La respuesta producida por la leche desnatada enriquecida provocó un aumento de $7,8 \text{ nmol L}^{-1}$ (IC_{95%} 3,12 y 12,6; $p=0,003$) mayor que la leche entera, a pesar de que el aporte de retinol con la leche desnatada enriquecida era el doble que con la leche entera. Al comparar este incremento tras la ingesta de las dos leches enriquecidas, la leche entera enriquecida dio lugar a un aumento de $24,1 \text{ nmol L}^{-1}$ (IC_{95%} 9,7-38,3; $p=0,002$) mayor que tras el consumo de leche desnatada enriquecida, lo que es consistente con el contenido casi doble de retinol ingerido.

El AUC correspondiente a la respuesta de ésteres de retinilo en TRL para los tres tipos de ensayo se muestra en la tabla 9. La respuesta más marcada se observó con la la leche entera enriquecida y la menor con la la entera. No obstante, cuando ajustamos la respuesta obtenida en TRL según la cantidad de retinol ingerida con cada tipo de leche, la respuesta (AUC con los 7 tiempos) fue similar y no mostraron diferencias significativas entre los distintos tipos de leche consumida (figura 4). De forma similar, aunque el porcentaje de absorción fue muy amplio para los distintos tipos de leche, el promedio de absorción fue aparentemente similar para los tres tipos de leche, independientemente del contenido graso de la leche (ej. entera

versus desnatada) y de la cantidad de vitamina A ingerida (ca. 0,5- 4,0 μmol / 430 ml leche) (tabla 9).

Finalmente, en el periodo de tiempo evaluado (6,5 horas) se recuperaron los niveles basales, independientemente del tipo de leche ingerida (figura 3).

La variabilidad entre sujetos (coeficiente de variación, CV) en la respuesta de vitamina A, y por tanto en la absorción, tras la ingesta de los distintos tipos de leche fue alta (67% para la leche entera, 57% para la leche entera enriquecida y 78% para la leche desnatada enriquecida). La variabilidad intra-sujeto de la respuesta de vitamina A en TRL fue de un $38,5 \pm 20 \%$ ($\text{IC}_{95\%}$: 28,7 y 48,8) para los tres tipos de leche y se observaron correlaciones significativas, especialmente entre las dos leches enriquecidas (Spearman $r = 0,733$, $p < 0,001$).

5.2.3.1.2. Respuesta en suero.

Al igual que en TRL, el análisis del suero en los distintos tiempos reveló la presencia de vitamina A en forma de éster, fundamentalmente como palmitato de retinilo, además de otros ésteres de cadena larga pero en menor proporción (figura 5). Asimismo, en el punto donde se alcanza la concentración máxima, el palmitato de retinilo representa el 75% del total de los ésteres totales y el resto corresponde a uno o dos ésteres de cadena más larga.

Como en las fracciones TRL, la concentración de ésteres de retinilo totales aumenta tras la ingesta de los tres tipos de leche durante el periodo postprandial, alcanzando la concentración máxima entre las 2 y las 4 horas y con incrementos distintos dependiendo del tipo de leche ingerida (figura 6). El aumento observado fue de $81,9 \text{ nmol L}^{-1}$ ($\text{IC}_{95\%}$ 65,3 y 98,6; $p = 0,001$) para la leche entera enriquecida mientras que la ingesta de leche desnatada

más vitaminas dio lugar a un aumento de $23,3 \text{ nmol L}^{-1}$ (IC_{95%} 17, 1 y 29,6; $p=0,001$) mayor que la leche entera.

El AUC correspondiente a la respuesta de ésteres de retinilo en suero para los tres tipos de ensayo se muestra en la tabla 10. Al comparar la respuesta (C_{max}.) producida tras la ingesta de las dos leches enriquecidas, se vió que la leche entera enriquecida provocaba un aumento de $58,6 \text{ nmol L}^{-1}$ (IC_{95%} 43,5 y 73,7; $p=0,001$) más que tras el consumo de leche desnatada enriquecida. No obstante, al igual que en TRL, cuando ajustamos la respuesta obtenida en suero según la cantidad de retinol ingerida con cada tipo de leche, la respuesta (AUC con los 7 tiempos) fue similar y no mostraron diferencias significativas entre los distintos tipos de leche consumida (figura 6). De forma similar, aunque el porcentaje de absorción fue muy amplio para los distintos tipos de leche, el promedio de absorción utilizando el AUC en suero fue aparentemente similar para los tres tipos de leche (tabla 10, figura 7).

La variabilidad en el porcentaje de absorción de vitamina entre sujetos tras la ingesta de los distintos tipos de leche era también alta (55% para la leche entera, 41% para la leche entera enriquecida y 43% para la leche desnatada enriquecida). Asimismo, la variabilidad observaron correlaciones significativas entre las dos leches enriquecidas (Spearman $r= 0,796$, $p<0,001$).

5.2.3.2. Vitamina E

5.2.3.2.1. Respuesta en la fracción de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL).

El análisis de las fracciones de lipoproteínas ricas en triglicéridos en los distintos tiempos reveló la presencia de α -tocoferol libre. Sin embargo, la respuesta en TRL durante el periodo post-prandial no difería del valor basal en ninguno de los tiempos del estudio para ninguna de las leches ensayadas. Independientemente de la cantidad de vitamina E ingerida, los valores de AUC variaron entre 1200-1400 nmol/ L⁻¹ h⁻¹ con una gran variabilidad intra-grupo y sin diferencias significativas en las AUCs correspondientes a los tres tipos de leche (figura 8).

5.2.3.2.1. Respuesta en suero.

El análisis en suero también mostró la presencia únicamente de α -tocoferol libre y tampoco se observaron diferencias significativas en la concentración de este analito a lo largo del tiempo tras la ingesta de ninguno de los tipos de leche ensayados, independientemente de la cantidad de α -tocoferol ingerida (figura 9).

5.2.3.3. Control de calidad de las determinaciones de vitaminas A y E en suero y en TRL.

La calidad del análisis de vitaminas en suero y en TRL se evaluó mediante la participación periódica en el programa de Control de Calidad “Fat-Soluble Vitamins QA Programme” dirigido por el “National Institute of Standards & Technology” (NIST, USA). En el periodo en que se llevaron a cabo los análisis de suero y TRL (Round Robin 49 y 50), los resultados de los análisis realizados en muestras distribuidas por el NIST fueron clasificados con un 1 para los compuestos de interés (all-trans retinol, palmitato de retinilo, β -caroteno, α -y γ -tocoferol), excepto para α -y γ -tocoferol en el RR-50 que obtuvieron un valor de 2. La clasificación de resultados según estos valores (1, 2, 3 y 4) hace referencia al número de desviaciones estándar en las que se encuentra el valor determinado frente al valor asignado por el NIST.

5.2.4. Comparación cualitativa y cuantitativa de la respuesta obtenida en suero y TRL.

Independientemente de que se analice en TRL o en suero, la mayor concentración de ésteres de retinilo totales (palmitato de retinilo y otros ésteres) se obtiene tras la ingesta de leche entera enriquecida, seguida de la leche desnatada enriquecida y la leche entera, observándose una respuesta en parte proporcional a la cantidad de nutriente ingerido (figuras 3 y 6). Sin embargo, el porcentaje de absorción fue similar para los tres tipos de leche,

independientemente de la cantidad de grasa presente en la leche (entera o desnatada), cantidad de vitamina A ingerida forma química de la vitamina (natural o añadida).

Cuantitativamente, el área bajo la curva de la concentración de ésteres de retinilo totales en TRL representa el 53% del área bajo la curva calculada en suero en el caso de la leche entera, el 44% con la leche entera enriquecida y el 37% con la leche desnatada enriquecida. La correlación (r de Pearson) entre estas áreas medidas en TRL y suero fue $r=0,692$ ($p<0,001$) para la leche entera, $r=0,529$ ($p<0,01$) en la leche entera enriquecida y $r=0,455$ ($p<0,02$) para la leche desnatada enriquecida.

En cuanto a la vitamina E, el análisis del α -tocoferol determinado tanto en suero como en las fracciones TRL durante el periodo postprandial (6,5h) no mostró diferencias significativas tras la ingesta de ninguno de los diferentes tipos de leche ensayados (figuras 8 y 9).

5.2.5. Valoración de los diferentes métodos de cálculo de porcentajes de absorción de vitamina A.

Los resultados del cálculo de las áreas bajo la curva (concentración de ésteres de retinilo frente a tiempo) obtenidas utilizando 3 tiempos (AUC predictora) en TRL y suero, así como el porcentaje de absorción relativa de vitamina se muestran en la tablas 11 y 12. A nivel de grupo, el cálculo de la absorción de vitamina A utilizando valores de AUC convencional (7 puntos) variaba entre 8-41% mientras que utilizando la AUC predictora, el porcentaje de absorción obtenido fue del 6-36%.

Utilizando datos obtenidos en TRL, en promedio, el porcentaje de absorción calculado a partir de las áreas utilizando 3 puntos (AUC predictora) es entre 1-3% menor que cuando se calcula utilizando todos los puntos (AUC convencional, 7 puntos). De forma similar, al utilizar los valores determinados en suero, el porcentaje de absorción calculado utilizando la curva predictora es ca. 4% menor que el calculado a partir de las áreas bajo la curva convencional. A pesar de estas pequeñas variaciones, las AUC convencional y predictora mostraron diferencias significativas (T-Student para muestras pareadas, $p<0,05$). No obstante, los valores obtenidos mostraron una buena correlación (Pearson) entre ambas variables (AUCc y AUCp), tanto en suero como en TRL para los tres tipos de leche (figuras 10 y 11); en suero, $r=0,906$ ($p<0,001$) para leche entera, $r=0,912$ ($p<0,001$) para entera enriquecida, y $r=0,875$ ($p<0,001$) para desnatada enriquecida. En TRL, el coeficiente de Pearson fue $r=0,952$ ($p<0,001$) en leche entera, $r=0,886$ ($p<0,001$) para entera enriquecida y $r=0,810$ ($p<0,001$) para desnatada enriquecida.

Asimismo, utilizando el método descrito por Barua (1999) (1 punto = C_{\max}), la cantidad absorbida fue aproximadamente 1/4 -1/3 de la cantidad estimada con el AUC convencional, tanto en TRL como en suero (Tabla 13).

El estudio de concordancia entre las AUC convencionales y AUC predictoras (diagramas de Bland-Altman), tanto en suero como en TRL, mostraron que sólo un 5% de los valores estaban fuera de los límites de concordancia ($\text{media} \pm 2SD$) para cada tipo de leche (figuras 12a, 12b, 12c). La intercambiabilidad entre ambas variables se calculó mediante análisis de regresión lineal (Tabla 14), evidenciando que el AUC predictora proporciona una información similar a la proporcionada por el AUC convencional.

Asimismo, se evaluó la eficacia de la AUC predictora a la hora de clasificar los sujetos según la respuesta obtenida en los estudios de biodisponibilidad. Utilizando el total de datos de los tres ensayos (n=57) y el AUC convencional como referencia del porcentaje de absorción, la utilización de la AUC predictora permitía clasificar >90% de las respuestas en el mismo (61%) cuartil o cuartiles adyacentes mientras que sólo el 9% de los valores se clasificaron en cuartiles opuestos utilizando ambos métodos.

Tabla 6. Contenido de vitaminas A, E y carotenoides en leche enriquecida en vitaminas A y E (media \pm SD, $\mu\text{mol L}^{-1}$).

TIPO	MARCA	N	Lotes/ Envases por lote	retinol CV (%)	desviación ^b (%)	β -caroteno (trans + cis)	α -tocoferol CV (%)	desviación ^b (%)
Entera ^a	PASCUAL	4	4 / 6	6,9 \pm 1,5 (22)	+ 64	0,2 \pm 0,05 (28)	47,8 \pm 12,9 (27)	+ 37
Entera	CENTRAL LECHERA ASTURIANA	8	1 / 2	6,6 \pm 0,3 (5)	+ 57	0,2 \pm 0,02 (11)	45,2 \pm 5,0 (11)	+ 30
Semidesnatada	LAUKI	8	1 / 2	8,6 \pm 0,6 (7)	+ 105	0,1 \pm 0,03 (24)	2,2 \pm 0,4 (19)	- 94
Semidesnatada	PASCUAL	8	1 / 2	5,6 \pm 0,7 (12)	+ 33	0,1 \pm 0,04 (43)	49,0 \pm 2,1 (4)	+ 41
Semidesnatada	PULEVA	7	1 / 2	3,7 \pm 0,4 (11)	-12	0,1 \pm 0,04 (57)	c	
Desnatada	SVELTESSE	8	1 / 2	5,4 \pm 0,3 (5)	+ 29	nd	37,7 \pm 3,4 (9)	+ 8
Desnatada ^a	PASCUAL	6	3 / 6	3,3 \pm 0,8 (25)	- 21	0,1 \pm 0,05 (74)	45,14 \pm 12,6 (28)	+ 30
Desnatada	PULEVA	1	1 / 2	3,3 \pm 0,2 (5)	- 21	nd	c	

^a. Leche empleada en los ensayos de biodisponibilidad, ^b. Porcentaje de desviación frente al valor indicado en la etiqueta nutricional (vitamina A (retinol) 4,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$; vitamina E 34,83 $\mu\text{mol L}^{-1}$), ^c. Leche no enriquecida en vitamina E
nd (no detectado). Límites de detección 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (retinol y β -caroteno) y 0,23 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (α , γ - tocoferol)

Tabla 7. Niveles basales de vitaminas A y E en suero y TRL y perfil lipídico en los voluntarios al comienzo de cada ensayo de biodisponibilidad (n = 19; media \pm SD; $\mu\text{g}/100\text{ml}$)¹

Compuesto	Leche entera	Leche entera + vitaminas	Leche desnatada + vitaminas
Retinol (TRL)	8,32 \pm 3,87	8,9 \pm 5,40	8,22 \pm 3,38
Palmitato de retinilo (TRL)	0,14 \pm 0,18	0,14 \pm 0,22	0,09 \pm 0,10
α-tocoferol (TRL)	187,61 \pm 99,59	164,81 \pm 97,84	189,30 \pm 106,55
Retinol (suero)	50,05 \pm 11,97	53,03 \pm 16,35	50,92 \pm 13,47
Palmitato de retinilo (suero)	0,34 \pm 0,19	0,40 \pm 0,31	0,37 \pm 0,24
α-tocoferol (suero)	892,03 \pm 144,91	901,6 \pm 192,35	951,08 \pm 179,77
Colesterol total (mg/dl)	166,58 \pm 27,06	171,32 \pm 26,23	163,63 \pm 27,65
Triglicéridos (mg/dl)	60,32 \pm 24,81	70,21 \pm 37,14	68,63 \pm 35,70

1: no diferencia significativa entre hombres y mujeres, excepto para los niveles de retinol en suero (test- t-Student's, $p < 0,05$).

Tabla 8. Formas químicas, contenido y cantidad suministrada de vitaminas A y E en el estudio de biodisponibilidad.

LECHE	Formas químicas vitamina A	Contenido de retinol (media \pm SD, mmol L ⁻¹)	Retinol suministrado (rango, mmol/430 ml)	Formas químicas vitamina E	Contenido de α -tocoferol (media \pm SD, mmol L ⁻¹)	α -tocoferol suministrado (rango, mmol/430 ml)
Entera (n=12)	Palmitato de retinilo	1,46 \pm 0,36	0,48 – 0,92	α -tocoferol	1,87 \pm 0,63	0,41 – 1,08
Entera + vitaminas (3,6% grasa) (n=16)	Palmitato y acetato de retinilo	7,39 \pm 1,35	2,19 – 4,15	α -tocoferol acetato de tocoferilo	53,03 \pm 12,48	16,78 – 32,49
Desnatada + vitaminas (0,3% grasa) (n=6)	Acetato de retinilo	3,33 \pm 0,82	1,08 – 1,99	α -tocoferol acetato de tocoferilo	45,14 \pm 12,63	11,01 - 27,53

Límites de detección 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (retinol y β -caroteno) y 0,23 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (α , γ - tocoferol)

Tabla 9. Ésteres de retinilo totales **en TRL** durante el periodo post-prandial AUC (calculada con 7 tiempos), concentración máxima alcanzada, tiempo en el que alcanza la C_{máx} y porcentajes de absorción.

LECHE	AUC (nmol L ⁻¹ h ⁻¹)	C _{max} (nmol L ⁻¹)	Tiempo C _{max} (h)	Porcentaje de absorción Media (IC _{95%})
Entera	5,4 \pm 3,7	10,0 \pm 7,0	3,0 \pm 1,1	16,4 (11,0 - 21,7)
Entera + vitaminas	22,9 \pm 10,6	47,8 \pm 24	3,0 \pm 0,8	13,6 (9,9 - 17,4)
Desnatada + vitaminas	9,3 \pm 5,5	18,3 \pm 10,8	2,7 \pm 0,9	13,4 (8,4 - 18,4)

Tabla 10. Ésteres de retinilo totales **en SUERO** durante el periodo post-prandial AUC (calculada con 7 tiempos), concentración máxima alcanzada, tiempo en el que alcanza la C_{máx} y porcentajes de absorción.

LECHE	AUC (nmol L⁻¹ h⁻¹)	C_{max} (nmol L⁻¹)	Tiempo C_{max} (h)	Porcentaje de absorción Media (IC_{95%})
Entera	10,3 ± 6,3	19,7 ± 11,0	3,2 ± 0,9	29,5 (23,6 – 35,4)
Entera + vitaminas	51,6 ± 17,0	92,6 ± 35,6	3,0 ± 0,7	30,7 (22,5 - 38,9)
Desnatada + vitaminas	25,1 ± 7,2	42,6 ± 12,7	3,0 ± 1,0	33,9 (26,8 – 40,9)

Tabla 11. Ésteres de retinilo totales **en TRL** durante el periodo post-prandial AUC (calculada con 3 tiempos) y porcentaje de absorción (Guerçi y cols, 2001).

LECHE	AUC (nmol L⁻¹ h⁻¹)	Porcentaje de absorción Media (IC_{95%})
Entera	5,1 ± 4,21	15,4 (8,9 - 21,9)
Entera + vitaminas	18,9 ± 12,1	11,2 (7,2 - 15,2)
Desnatada + vitaminas	7,5 ± 5,1	10,5 (6,3 - 14,7)

Tabla 12. Ésteres de retinilo totales **en SUERO** durante el periodo post-prandial AUC (calculada con 3 tiempos) y porcentaje de absorción (Guerçi y cols, 2001).

LECHE	AUC (nmol L⁻¹ h⁻¹)	Porcentaje de absorción Media (IC_{95%})
Entera	8,5 ± 5,8	25,3 (17,0-33,6)
Entera + vitaminas	47,2 ± 22,1	26,9 (20,2-33,5)
Desnatada + vitaminas	22,1 ± 7,7	29,6 (23,0-36,2)

Tabla 13. Porcentaje de absorción **en TRL y SUERO** con la concentración de ésteres de retinilo totales máxima (Cmax) (Barua, 1999).

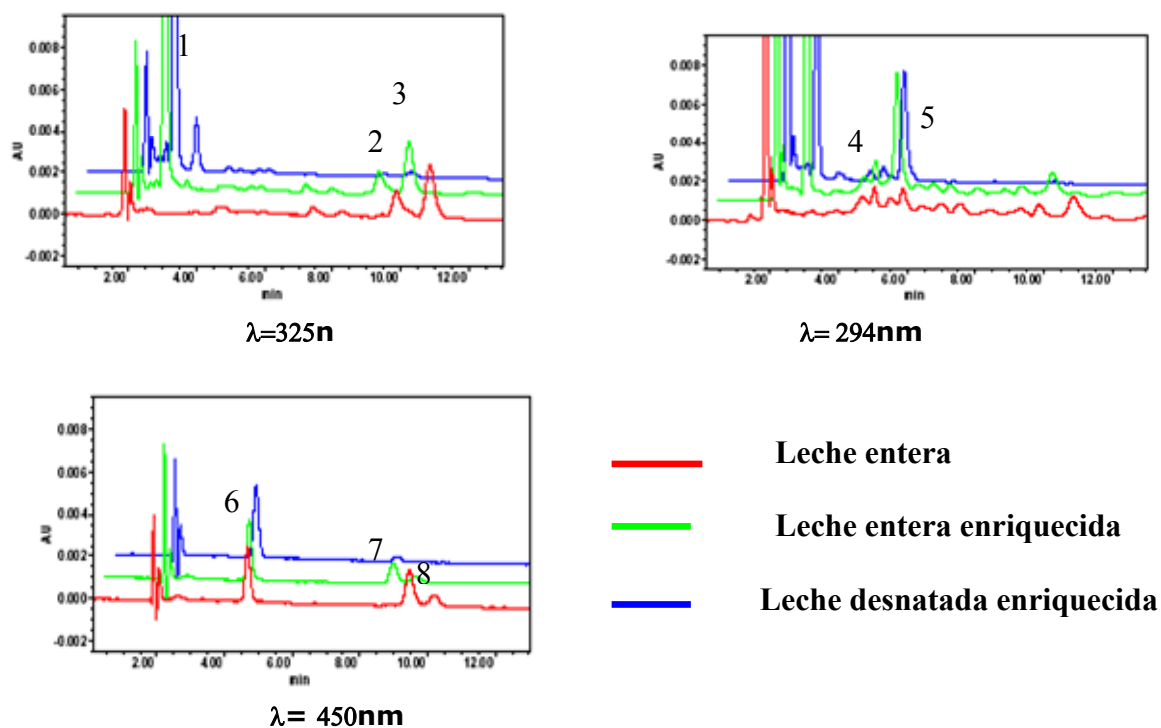
LECHE	Porcentaje de absorción Media (IC_{95%})	
	TRL	Suero
Entera	4,5 (2,5 – 6,1)	9,1 (6,8 – 11,4)
Entera + vitaminas	4,4 (3,1 – 5,7)	9,0 (6,9 – 11,1)
Desnatada + vitaminas	4,0 (2,5 – 5,6)	8,9 (7,1 – 10,8)

Tabla 14. Expresiones matemáticas para predecir el área bajo la curva convencional en función del área bajo la curva predictora.

TIPO DE LECHE	SUERO	TRL
Entera.	$y = 0,675 + 0,975x \pm 2 (0,937)$ $r = 0,906, p < 0,001$	$y = 0,475 + 0,850 x \pm 2 (0,404)$ $r = 0,952, p < 0,001$
Entera + vitaminas	$y = 6,289 + 0,704 x \pm 2 (2,457)$ $r = 0,912, p < 0,001$	$y = 2,803 + 0,776 x \pm 2 (1,724)$ $r = 0,886 p < 0,001$
Desnatada + vitaminas	$y = 2,339 + 0,825 x \pm 2 (1,232)$ $r = 0,875, p < 0,001$	$y = 0,957 + 0,872 x \pm 2 (1,131)$ $r = 0,810, p < 0,810$

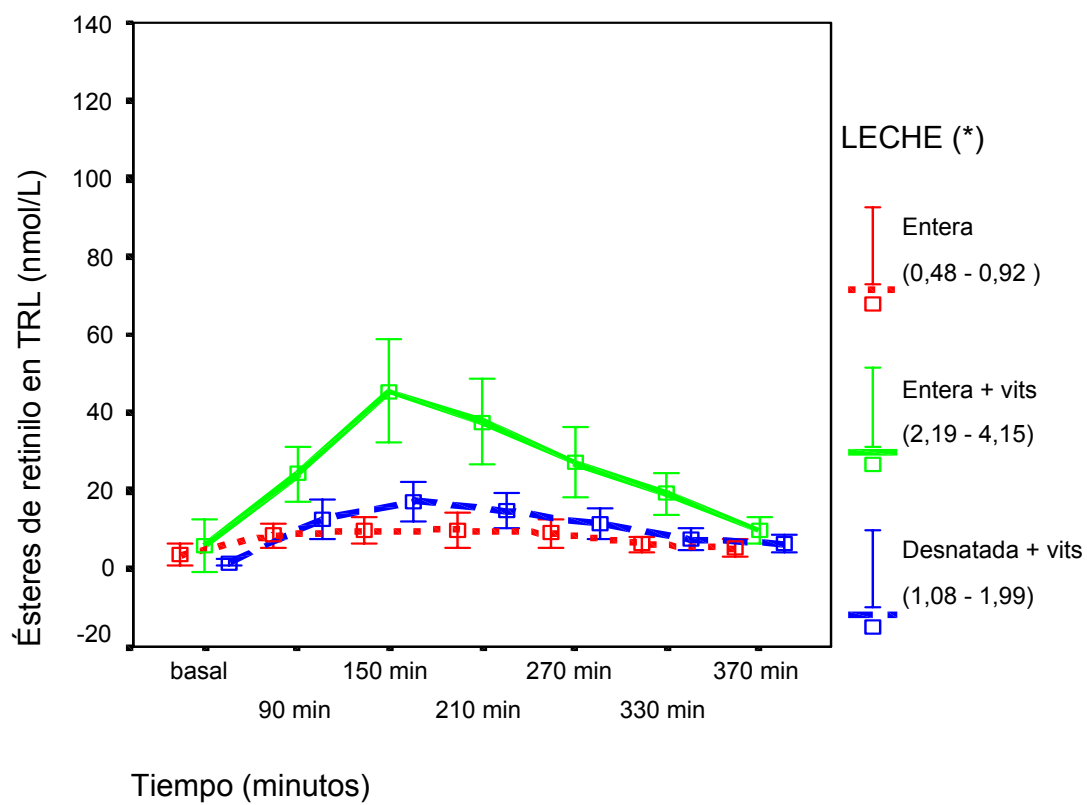
y: AUC convencional. x: AUC predictora.

Figura 2. Formas individualizadas de vitaminas A, E y carotenoides en los distintos tipos de leche empleada en el estudio de biodisponibilidad



1 acetato de retinilo, 2 éster de retinilo sin identificar,
 3 palmitato de retinilo, 4 α -tocoferol, 5 acetato de tocoferilo,
 6 β -criptoxantina (estándar interno), 7 y 8 β - caroteno (trans y cis)

Figura 3. Ésteres de retinilo en TRL durante el periodo post-prandial, tras la ingesta de los tres tipos de leche.



(*) Cantidad de retinol ingerida (μ moles/430ml)

Figura 4. Respuesta de ésteres de retinilo en TRL ajustada a la cantidad de retinol ingerida.

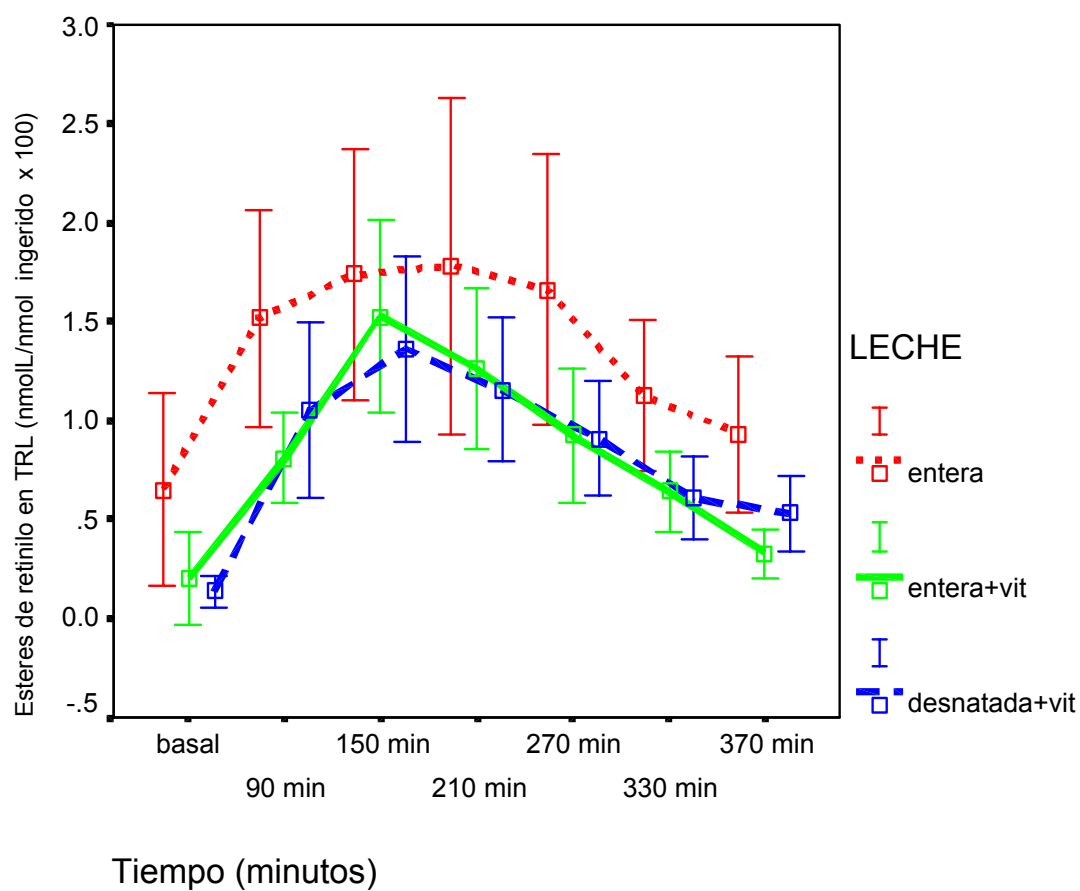


Figura 5. Respuesta en suero (ésteres de retinilo) tras la ingesta de leche entera enriquecida en el momento en el que se alcanza la concentración máxima.

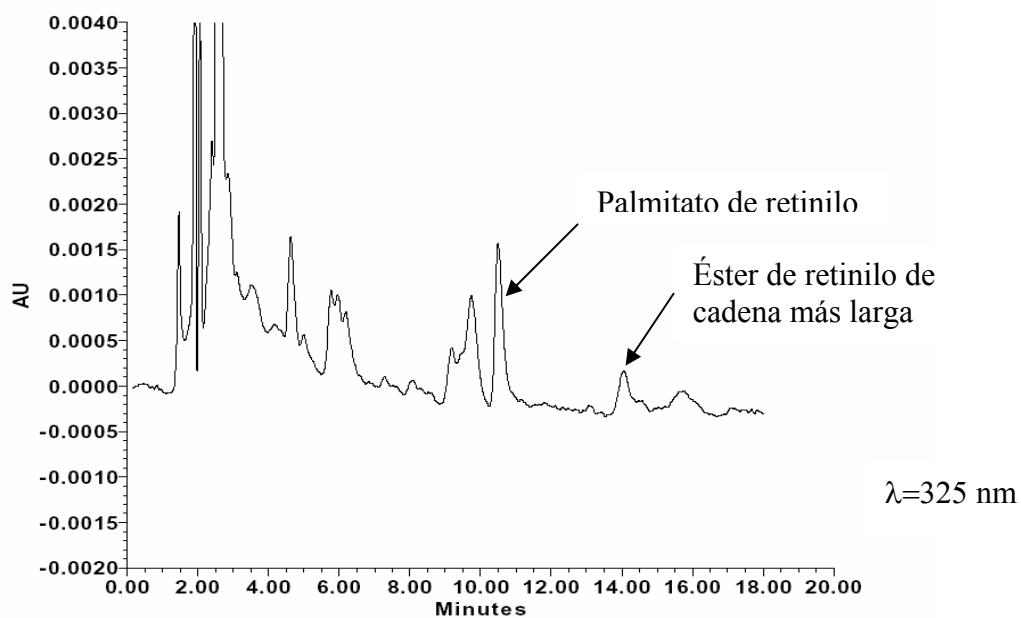
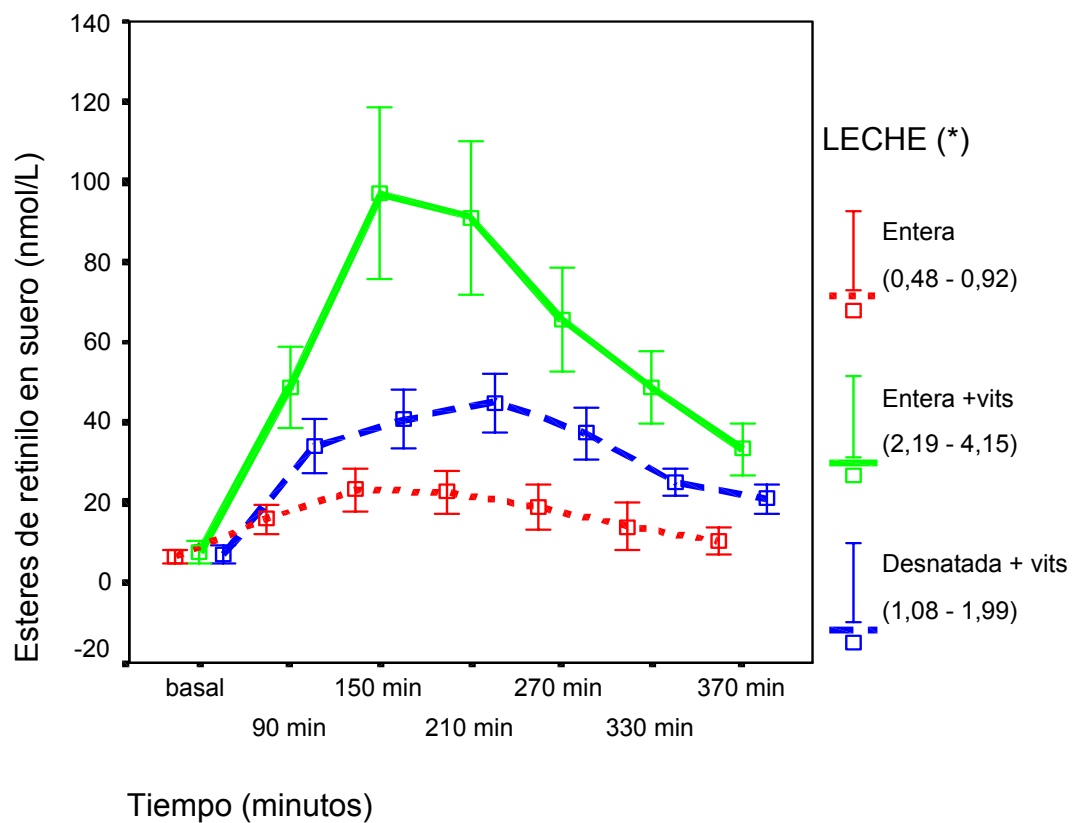


Figura 6. Ésteres de retinilo en suero durante el periodo post-prandial tras la ingesta de los distintos tipos de leche.



(*) Cantidad de retinol ingerida ($\mu\text{mol}/430\text{ml}$).

Figura 7. Respuesta de ésteres de retinilo en suero (nmol/L) ajustada a la cantidad de retinol ingerida.

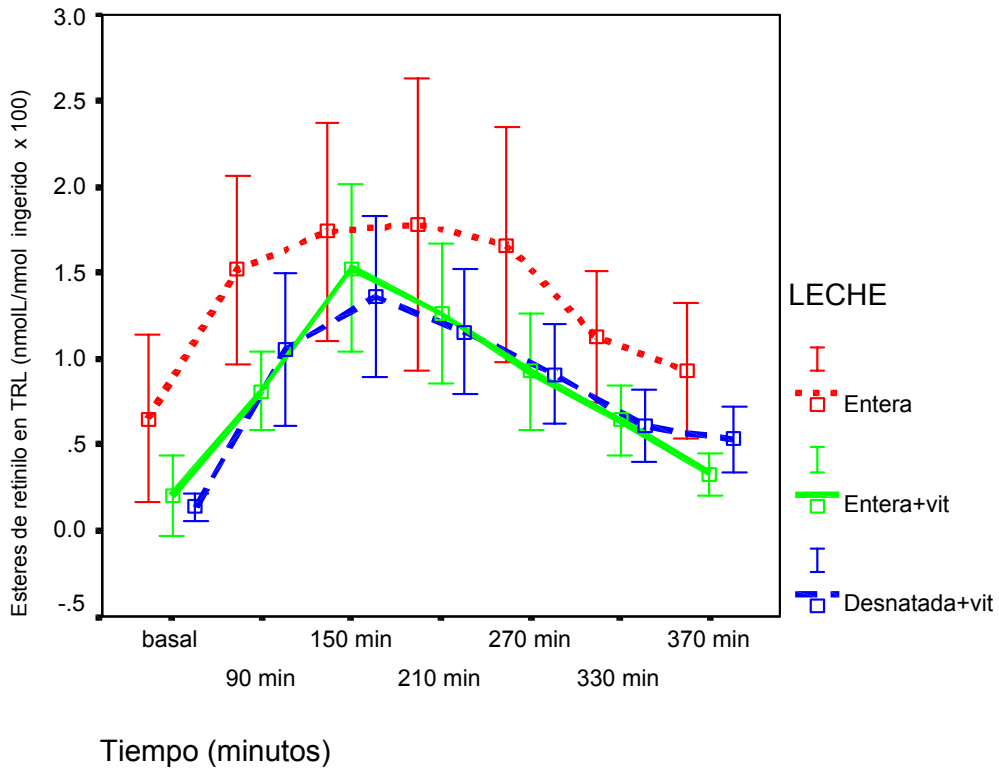
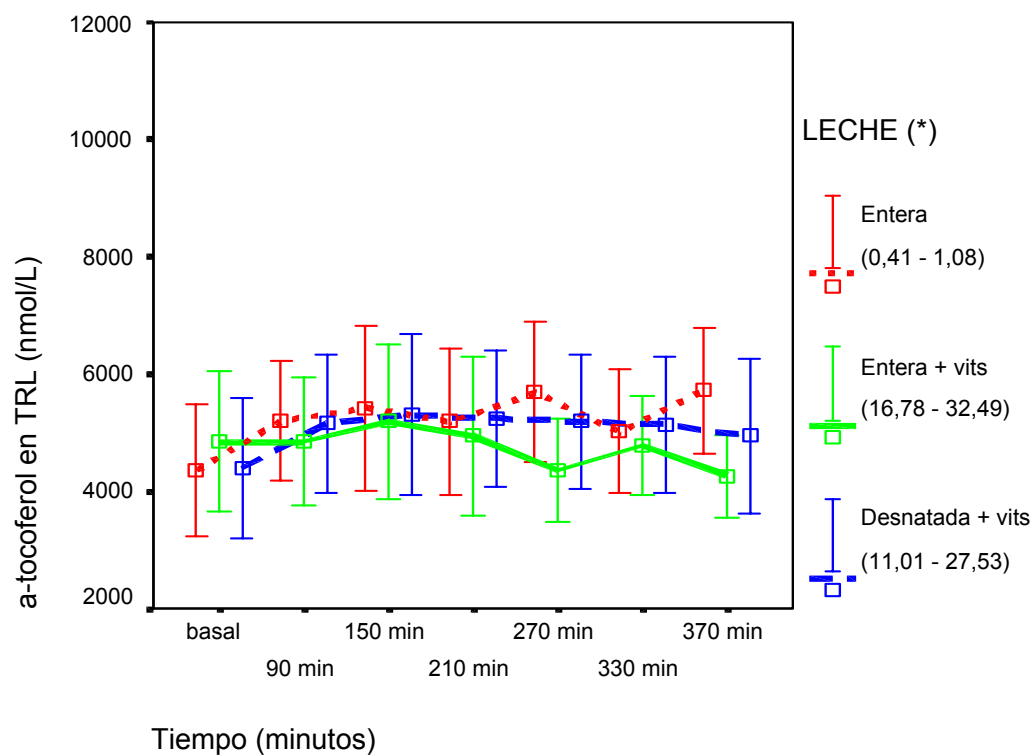
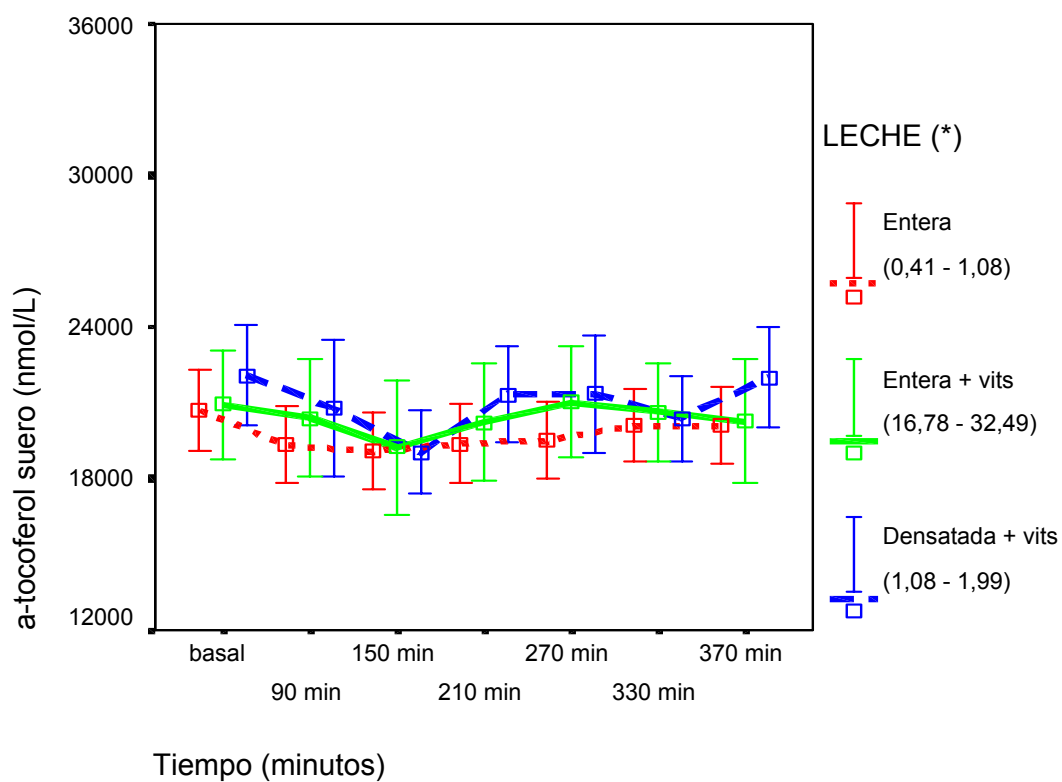


Figura 8. α -tocoferol en TRL en el periodo post-prandial tras la ingesta de los tres tipos de leche.



(*) Cantidad de α -tocoferol ingerida (μ mol/430ml).

Figura 9. α -Tocoferol en suero durante el periodo post-prandial, tras la ingesta de los distintos tipos de leche.



(*) Cantidad de α -tocoferol ingerida ($\mu\text{mol}/430\text{ml}$)

Figura 10. Relación entre las áreas bajo la curva (ésteres de retinilo totales en suero frente a tiempo) calculadas con 7 y 3 tiempos (convencional y predictora), respectivamente.

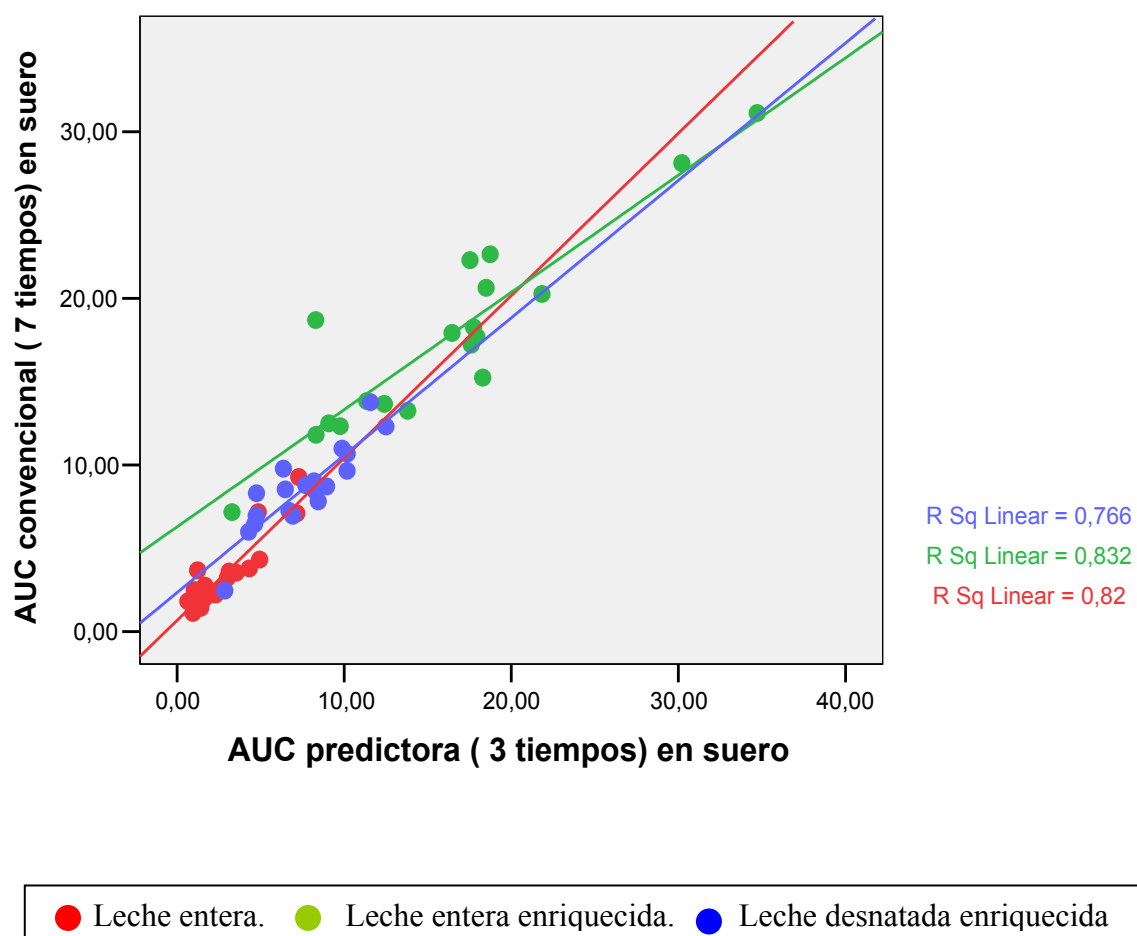


Figura 11. Relación entre las áreas bajo la curva (ésteres de retinilo totales en TRL frente a tiempo) calculadas con 7 y 3 tiempos (convencional y predictora), respectivamente.

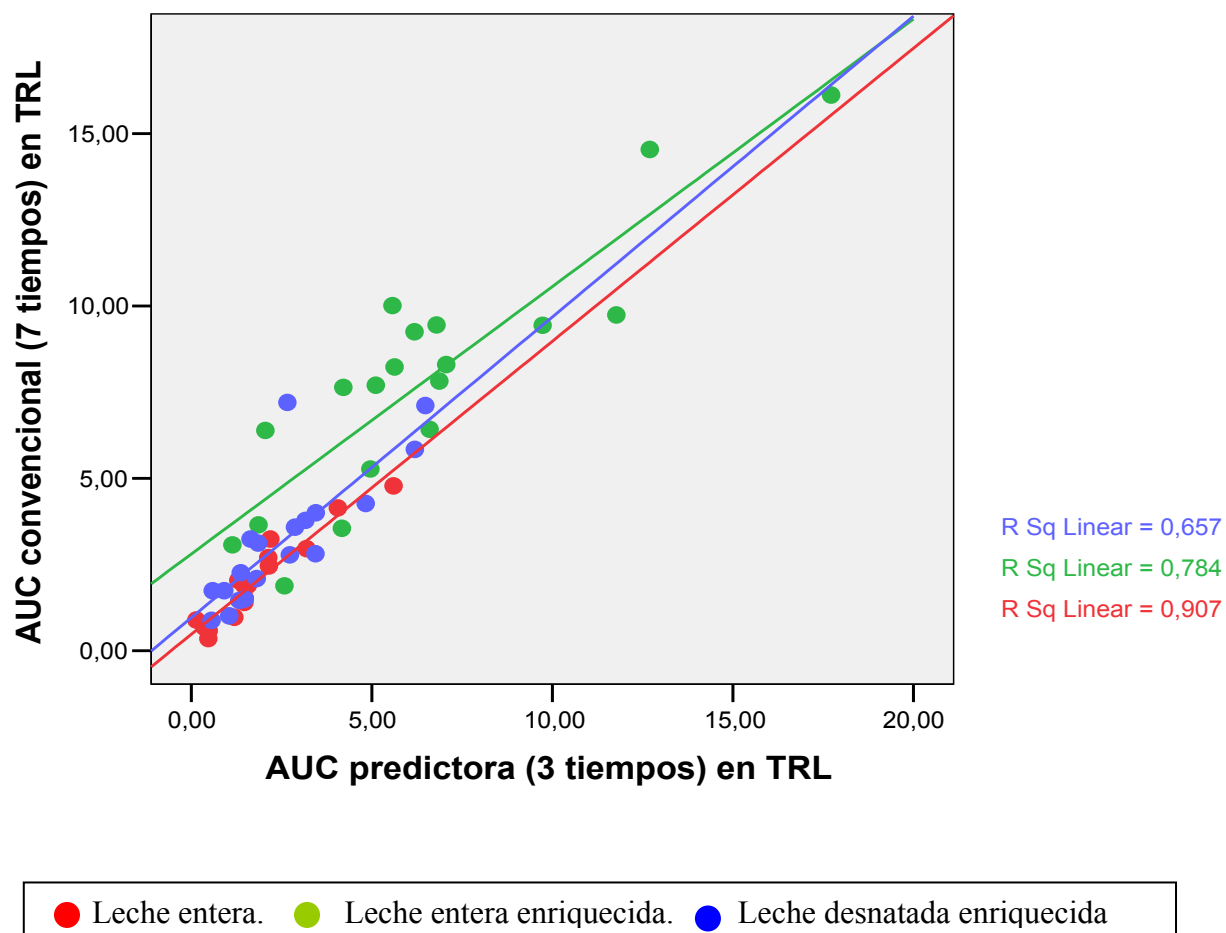
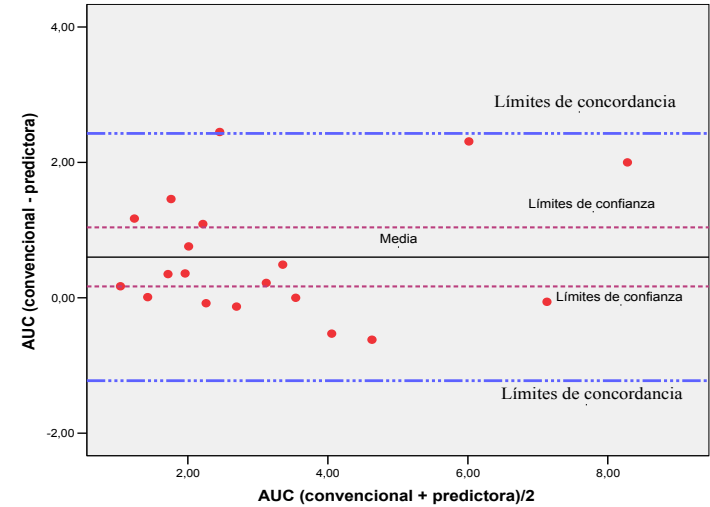
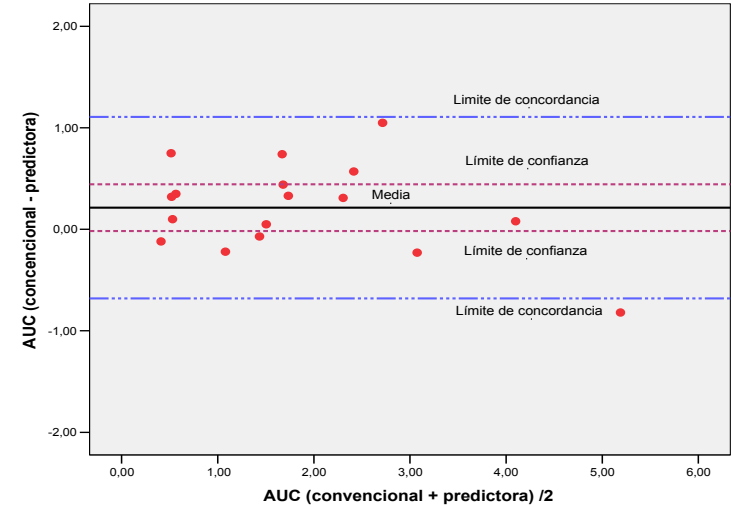


Figura 12. Concordancia de medidas. Diagramas de Bland Altman. AUC (ésteres de retinilo en suero y TRL durante el periodo postprandial, $\mu\text{g/L/6,5h}$) convencional y predictora tras la ingesta de los distintos tipos de leche (a, b,c)

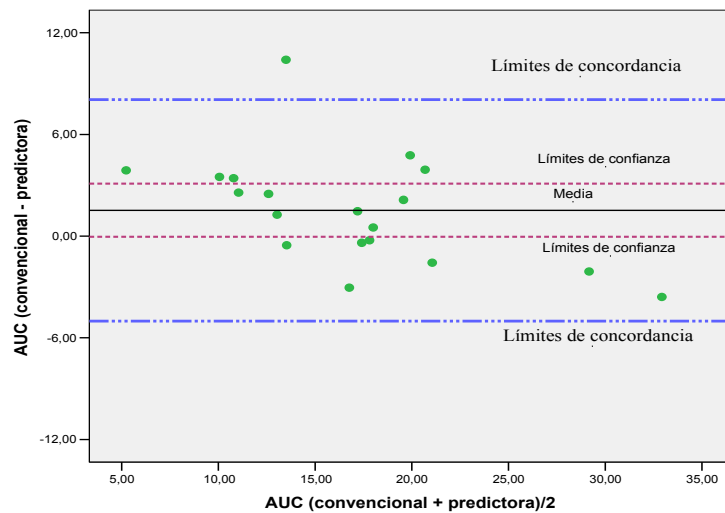
12 a. **LECHE ENTERA (SUERO)**



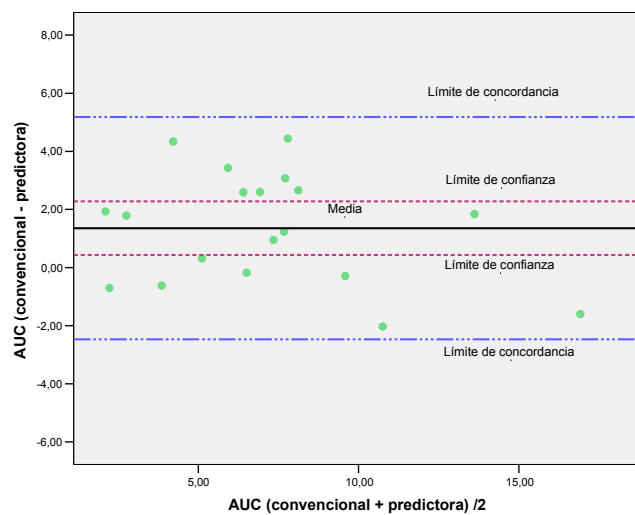
LECHE ENTERA (TRL)



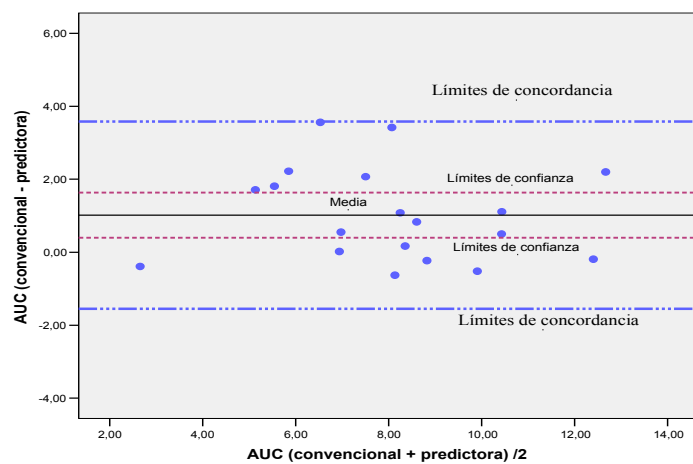
12 b . LECHE ENTERA ENRIQUECIDA (SUERO)



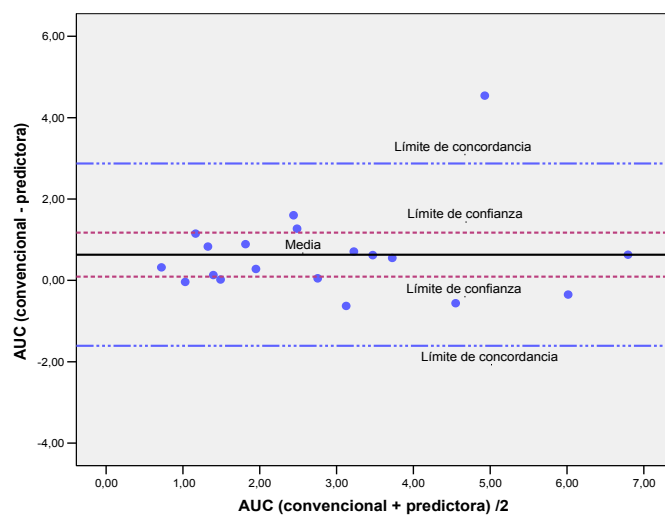
LECHE ENTERA ENRIQUECIDA (TRL)



12 c. LECHE DESNATADA ENRIQUECIDA (SUERO)



LECHE DESNATADA ENRIQUECIDA (TRL)



DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Los productos lácteos enriquecidos con vitaminas constituyen una cuota de mercado en continuo crecimiento. Sin embargo hay muy pocos estudios sobre contenido de micronutrientes y su biodisponibilidad a partir de estos alimentos. Los resultados obtenidos en nuestro estudio aportan información sobre vitaminas A, E y carotenoides, identificando formas químicas presentes y valorando su contenido total en diferentes tipos de leche, así como aportando datos sobre la absorción en humanos de estos compuestos a partir de leche entera y enriquecidas disponibles en el mercado.

6.1 Análisis de vitaminas A, E y carotenoides en leche (entera, semidesnatada, y desnatada) enriquecida en vitaminas A y E.

Las Tablas y Bases de Datos de Composición de Alimentos están en continua revisión desde hace años, unificando criterios de recogida de datos y análisis, que permitan el uso y comparación de datos sobre alimentos tradicionales en un amplio rango de países, así como para ampliar la información sobre nutrientes y compuestos biológicamente activos con potenciales efectos sobre la salud, incluyendo nuevos productos de la industria alimentaria. Actualmente, en Europa se encuentra en curso el proyecto EuroFir, con los objetivos anteriormente mencionados, y en el cual participa España, donde tendrá continuidad en el tiempo gracias al apoyo institucional de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Por ello la aportación de nueva información sobre el contenido de vitaminas A y E en alimentos enriquecidos determinada mediante metodología precisa y con

control de calidad es importante, dado que esas tablas serán guías muy útiles para los profesionales de la nutrición y salud pública.

6.1.1. Control de calidad.

El método desarrollado para la determinación de vitaminas A, E y carotenoides en leche líquida ha sido validado utilizando materiales de referencia y aplicado al análisis de otros productos lácteos y derivados comercialmente disponibles (Herrero, 2003; Herrero-Barbudo y cols, 2005). La variabilidad del método analítico empleado, en el día y entre días, es menor del 5 y el 10 % respectivamente para el retinol y menor del 10 y el 15% para el α -tocoferol (Herrero-Barbudo y cols, 2005) y es comparable a la que presentan otros métodos analíticos (Ollilainen y cols, 1989; Chase y Long, 1998; Gomis y cols, 2000) y a la mostrada en estudios entre laboratorios utilizando muestras y metodología común (Hite, 2003). En cuanto a la exactitud asociada a nuestros datos, el grado de desviación frente al valor asignado en los materiales de referencia analizados, permite considerarlos fiables en el caso de las leches líquidas con distinto contenido graso.

6.1.2. Formas químicas presentes y contenido total.

El método de análisis utilizado ha permitido determinar de forma simultánea, en alimentos de base láctea, enriquecidos o no, retinol, acetato de retinilo, palmitato de retinilo, β -caroteno (formas *cis*- y *trans*-), α -tocoferol, γ -tocoferol y acetato de tocoferilo (Herrero-Barbudo y cols, 2005). En la leche entera se identificaron retinol y palmitato de

retinilo (éster mayoritario) como componentes de la vitamina A y α -tocoferol como la forma natural de vitamina E (Herrero, 2003). En las leches enriquecidas, además de las formas naturales, anteriormente mencionadas, se encontraron acetato de retinilo y acetato de tocoferilo como formas añadidas.

El succinato de tocoferilo es una forma de vitamina E autorizada para el enriquecimiento de alimentos y se puede detectar a una longitud de onda de 286 nm (Merck Index, 1983). No, obstante, el análisis de vitaminas E por HPLC en los tres tipos de leche permitió comprobar la ausencia de otros picos cromatográficos aparte de los de acetato de tocoferilo y α - tocoferol. Asimismo, los cálculos estequiométricos realizados tras la hidrólisis de la leche enriquecida sugerían la ausencia de otras formas éster añadidas en el alimento.

En cuanto al contenido de vitaminas A y E en las distintas marcas de leche enriquecida (UHT o Uperisada), los análisis mostraron que había diferencias (tanto por exceso como por defecto) respecto a lo indicado en la etiqueta, coincidiendo con lo descrito previamente por otros autores (Hicks y cols, 1996; Murphy y cols, 2001) y por estudios anteriores nuestros (Herrero-Barbudo y cols, 2005).

Las discrepancias entre el resultado obtenido del contenido de vitaminas A y E determinado en las leches enriquecidas y los referenciados en las etiquetas podrían explicarse en alguna medida si se conociera con exactitud si la información que aparece en la etiqueta nutricional corresponde a la cantidad añadida, a la presente o a la cantidad mínima que tiene que tener el producto a fecha de caducidad.

6.1.2.1. Adecuación a la legislación.

Las formas químicas de vitaminas identificadas en los productos lácteos enriquecidos analizados, comercialmente disponibles, se ajusta a las normativas que regulan la adición de vitaminas y otros compuestos a los alimentos (Real Decreto 1275/2003 y (CE) N° 1925/2006). De acuerdo a la legislación, “la vitamina A puede ser añadida a los alimentos en distintas formas químicas retinol, acetato de retinilo, palmitato de retinilo, β -caroteno y la vitamina E con D- α -tocoferol (RRR- α -tocoferol), DL- α -tocoferol (RRS, RSR, RSS, SRR, SSR, SRS- α - tocoferol), acetato de D- α - tocoferilo, acetato de DL- α tocoferilo, succinato ácido de D- α -tocoferilo”. En el Reglamento Europeo se especifica que “las vitaminas podrán añadirse en una forma biodisponible para el organismo humano”.

En el Reglamento Europeo (CE N° 1925/2006) se contempla la adición de vitaminas como “restitución” cuando puedan perderse en el curso de una correcta práctica de fabricación o durante los procedimientos normales de almacenamiento y manipulación. Además, según indica el informe “Food Fortification Basics: Milk” (USAID, 1999), la adición de vitaminas se realiza antes de los procesos térmicos (pasteurización, UHT, uperización) teniendo en cuenta las posibles pérdidas de vitaminas debidas a estos procesos, por lo que las cantidades añadidas suelen ser mayores. Esto explicaría, en parte, la presencia de cantidades de vitaminas superiores a lo indicado en la etiqueta de la leche analizada.

En España, de acuerdo al RD 1275/2003, “el contenido de éstas [vitaminas] será tal que la ingesta diaria recomendada por el fabricante en el etiquetado no aporte una cantidad inferior al 15% ni superior al 100 % de la cantidad diaria recomendada (CDR)”. En base a nuestros análisis, la mayoría de las marcas y tipos de leche enriquecidas estaban dentro de la

normativa dado que el contenido de vitaminas A y E en 100ml no excedía del 100% de las CDR (1000 y 800µg de retinol / 100ml, para hombres y mujeres respectivamente y 12mg de α-tocoferol/100ml para ambos sexos) (Moreiras y cols, 1996; 2004) y solo ocasionalmente, en algunas leches (desnatadas parcial o totalmente y enriquecidas) el contenido determinado por HPLC era menor del 15% de las CDR (120µg/100ml para la vitamina A y 1,8mg/100ml para la vitamina E).

Actualmente, el Reglamento europeo (CE 1925/2006) indica que las cantidades máximas a añadir al alimento “se fijarán teniendo en cuenta: a) los niveles máximos de seguridad de vitaminas establecidos mediante la determinación científica del riesgo a partir de los datos científicos generalmente reconocidos, teniendo en cuenta, según proceda, los diferentes grados de sensibilidad de las distintas categorías de consumidores y b) la ingesta de vitaminas a partir de otras fuentes de la dieta”. El presente estudio aporta datos útiles para el cálculo de la ingesta de vitaminas en la población, necesarios también para establecer los niveles de seguridad en la ingesta de vitaminas a partir de alimentos y de otras fuentes.

6.1.2.2 Variabilidad en el contenido de vitaminas A y E.

En el presente trabajo hemos observado diferencias en el contenido de vitaminas en las leches, entre marcas, dentro de una misma marca entre lotes, así como entre envases del mismo lote. La variabilidad en el contenido de vitaminas A y E entre marcas en la leche con distinto porcentaje de grasa y enriquecida (5 marcas) (Herrero-Barbudo y cols, 2005), generalmente es mayor que la presente de forma natural en la leche entera (9 marcas) (Herrero, 2003; Herrero-Barbudo y cols, 2005). Dentro de una misma marca, la variabilidad

del contenido de vitaminas A y E entre lotes es similar independientemente del tipo de leche analizada (entera y enriquecidas con distinto porcentaje de grasa) y en cuanto a la variabilidad de contenido en los envases del mismo lote en los diferentes tipos de leche enriquecida, ésta es mayor en la leche parcial y totalmente desnatada que en la leche entera enriquecida.

En los distintos tipos de leche enriquecida ensayados (entera y parcial o totalmente desnatada) se observan diferencias en su contenido, aunque en la etiqueta siempre se indique la misma cantidad 120µg retinol /100ml y 1,5 mg tocoferol /100ml (tabla 6). Estas discrepancias podrían producirse por diversas razones como son: 1) la adición de vitaminas, según la marca, se realiza en distintos momentos del procesado, antes o después de la normalización del contenido de grasa; 2) el añadir una cantidad de vitaminas sin cuantificar antes lo que hay de forma natural (Hicks y cols, 1996); 3) las condiciones de almacenaje podían no ser óptimas (Vidal-Valverde y cols, 1992 y 1993, describen pérdidas de retinol y tocoferol en leche entera UHT almacenada durante periodos largos, dentro de la vida útil del producto, y a distintas temperaturas); 4) la forma química (ej. retinol, palmitato de retinilo, acetato de retinilo) de la vitamina añadida, así como la forma de vehiculizarla (ej. modificando su hidro o liposolubilidad) y la estabilidad (caducidad) del vitámero a añadir; 5) la estabilidad de las vitaminas adicionadas a diversas matrices (leche entera o desnatada). Este último punto ha sido objeto de discusión y diversos autores han afirmado que la vitamina A añadida era más estable en leche entera que en leche parcial o totalmente desnatada (Coulter & Tomas, 1968; Wollard & Fairweather, 1985), presumiblemente debido a los antioxidantes naturales que posee la grasa de la leche (ej. la vitamina E).

6.2. Estudio de biodisponibilidad en sujetos control.

6.2.1. Metodología para el estudio de biodisponibilidad de vitaminas A y E.

La elección de la metodología empleada en nuestro ensayo se realizó en base a las siguientes premisas: 1) el estudio de la fracción de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) durante el metabolismo postprandial permite evaluar las pequeñas variaciones de la concentración de un compuesto en plasma debidas a la absorción *de novo* frente a la proporción de nutriente endógeno (Jessen y cols, 1988; Van Vliet y cols, 1995; Brown y cols, 2004); 2) en la absorción de la vitamina A (preformada o como carotenoides provitamínicos) tiene lugar la esterificación del retinol con ácidos grasos de cadena larga, su posterior incorporación a QM, y finalmente, la secreción de los QM a torrente linfático (Li & Tso, 2003); 3) en condiciones de ayuno no hay ésteres de retinilo presentes en plasma o si los hay son en concentraciones muy bajas (Blomhoff, 1994); 4) la presencia y concentración de ésteres de retinilo en el plasma después de la administración de vitamina A ha sido utilizada como un indicador de la presencia de quilomicrones y quilomicrones remanentes (Berr y cols, 1984; Renuka y cols, 2001)

Cuando se analiza plasma procedente de metabolismo post-prandial los ésteres de retinilo se encuentran fundamentalmente en quilomicrones grandes y cantidades muy pequeñas en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Harrison, 2005). En contraste con los triglicéridos o ésteres de colesterol y otros lípidos (ej. α -tocoferol), los ésteres de retinilo no están presentes en otras lipoproteínas como IDL, LDL o HDL.

La utilización de los ésteres de retinilo de quilomicrones como marcador de lipoproteínas de origen intestinal viene avalada por tres razones: la vitamina A es incorporada dentro de las lipoproteínas como palmitato de retinilo por el intestino durante la absorción de la grasa; el intercambio del palmitato de retinilo entre lipoproteínas es mínimo o inexistente al menos durante las primeras 6-8 horas (Krasinski y cols, 1990) después de la ingesta y porque el palmitato de retinilo permanece asociado con la misma lipoproteína desde su secreción por el intestino hasta su incorporación al hígado (Lemieux y cols, 1998). No obstante, la cuestión de si los ésteres de retinilo son el marcador más fiable de las lipoproteínas de origen intestinal o si es la concentración de la apolipoproteína apo B-48 es todavía objeto de discusión (Ruotolo y cols, 1992; Renuka y cols, 2001).

En nuestro estudio, la determinación de la vitamina A en TRL nos ha proporcionado información cualitativa sobre la respuesta (ésteres de retinilo presentes) tras la ingesta de los distintos tipos de leche y cuantitativa respecto al tipo de leche que provocaba mayor respuesta, el tiempo en el que la concentración de ésteres de retinilo alcanza el máximo, la recuperación de niveles basales y el AUC para calcular la cantidad de retinol absorbida.

Aunque está descrita la transferencia de vitamina E entre lipoproteínas durante el período postprandial, la absorción de la vitamina E a partir de leches comerciales también se valoró en TRL y en suero, pero no se obtuvo una respuesta valorable a lo largo del tiempo del estudio. Según un reciente estudio, la utilización del marcaje mediante isótopos estables parece el método de elección para detectar cambios en la absorción de vitamina E a partir de alimentos enriquecidos (Bruno y cols, 2006), ya que las cantidades de nutrientes ingeridas a partir de estos alimentos no son muy altas (cantidades próximas a las RDA) en comparación con las aportadas por los suplementos o preparados comerciales. En cuanto a la vitamina E,

en el planteamiento de este estudio no se contempló la idea de modificación de un alimento que ya había sido modificado por la industria (enriqueciéndolo con vitaminas), y el objetivo era realizar los ensayos de biodisponibilidad con leche comercialmente disponible.

El método empleado para el aislamiento de TRL es el descrito por Griffiths y cols. (1994) para el estudio del metabolismo lipídico postprandial y ha sido utilizado en nuestro laboratorio en estudios previos de biodisponibilidad de carotenoides (Granado, 1998). En la separación de TRL se utiliza 1ml de plasma, lo que implica que el volumen de muestra (sangre) tomado a los voluntarios en cada tiempo del periodo postprandial es pequeño. Sin embargo, otros autores defienden el uso de volúmenes de plasma iniciales entre 2 y 5 ml e indican que la utilización de mayores volúmenes puede facilitar el manejo de la muestra (separación de fases, extracción de analitos, reconstitución) y minimizar posibles errores de pérdidas debidos a la manipulación (Van Vliet y cols, 1995; Borel y cols, 1997;1998; Van het Hof y cols, 2000; Park y cols, 2000; Guerci y cols, 2001; Pérez-Martínez y cols, 2004; Faulks y cols, 2004; Jeanes y cols, 2005; Agreen y cols, 2005). En nuestro ensayo quizás la utilización de volúmenes mayores podría haber favorecido la manipulación de la muestra e incluso quizás haber minimizado las interferencias en el valor basal, lo que podría explicar en parte la falta de respuesta observada en el α -tocoferol.

Asimismo, las condiciones de *centrifugación* descritas para la separación de TRL varían mucho entre estudios utilizándose diversas combinaciones de revoluciones y tiempo; baja velocidad durante más tiempo (12.000-18.000g, 30-120 minutos) (Granado y cols, 1998; Agren y cols, 2005) o viceversa (20.000-150.000g, 15 a 60 minutos) (Van Vliet y cols, 1995; Borel y cols, 1997, 1998; Van het Hof y cols, 2000; Park y cols, 2000; Guerci y cols, 2001; Pérez-Martínez y cols, 2004; Jeanes y cols, 2005), u otras combinaciones (64.000g durante

4h) (Faulks y cols, 2004). Así mismo, dado que la ingesta de diferentes alimentos (leche entera o preparado lácteo infantil) da lugar a quilomicrones con diferente composición y tamaño (German y Dillard, 2006), no podemos descartar que los distintos tipos de leche aportados en nuestro estudio, aún manteniendo una desayuno estándar (tabla 3), pudieran haber afectado la separación de las fracciones TRL.

Al comienzo de cada estudio, en sangre basal de los sujetos en ayunas (mínimo 8 h) no hay quilomicrones, por lo que las concentraciones de ésteres de retinilo y de α -tocoferol debería ser teóricamente 0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$. En nuestro estudio, la cantidad de vitamina A (en forma de ésteres de retinilo) en las TRL era inferior al límite de cuantificación (0,2 μg / 100ml), aunque en el caso de la vitamina E, el α -tocoferol cuantificado fue <300 $\mu\text{g}/100\text{ml}$. Una posible explicación para la presencia de α -tocoferol en ayunas en TRL sería la existencia de interferencias con otras fracciones del plasma. El diferente comportamiento entre las dos vitaminas puede radicar en las concentraciones sustancialmente diferentes de ambos compuestos en sangre (palmitato de retinilo, normalmente < 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ vs α -tocoferol, 700 - 1800 $\mu\text{g}/\text{dl}$). No obstante, incluso con la utilización de técnicas más sensibles, como es la ultracentrifugación, se ha descrito una separación incompleta de las fracciones VLDL y QM (Cohn, 1997).

6.2.2. Respuestas obtenidas en TRL y suero.

El análisis de las *fracciones de lipoproteínas ricas en triglicéridos* en los distintos tiempos reveló la presencia de vitamina A en forma de éster, fundamentalmente como palmitato de retinilo, así como otros ésteres de cadena larga aunque en menor proporción, lo

que coincide con lo descrito por otros autores que identificaron estearato de retinilo y linoleato de retinilo en metabolismo post-prandial cuando las cantidades de retinol ingeridas eran mayores (Kern y Everson, 1987; Borel y cols, 1998; Sauvant y cols, 2003; Debier y Larondelle, 2005). La concentración total de ésteres de retinilo alcanza la concentración máxima entre las 2 y 4 horas, independientemente del tipo de leche, lo que también es consistente con lo descrito por otros autores en estudios con personas de edades similares a nuestro grupo, tras ingerir diversas formulaciones de vitamina A junto con leche, nata, tostada con mantequilla, o bien vitamina A a partir de alimentos ricos en carotenoides, como puré de zanahoria y sopa de verduras (Borel y cols, 1998; Renuka, y cols, 2001; Cardinault y cols, 2003).

En el caso de la vitamina E, la variación de la concentración de α -tocoferol en quilomicrones durante el periodo postprandial no fue significativa y por tanto, no se pudo valorar el porcentaje de absorción frente a la cantidad suministrada 0,2-14 mg de α -tocoferol (0,41-32,49 μ moles). En otros estudios se han observado respuestas tras la ingesta de cantidades superiores a 150mg, con cantidades de grasa variables (0-17,5g) (Hayes y cols, 2001; Jeanes y cols, 2004) y en otros casos en los que empleaban 432-937 mg de α -tocoferol (913-1982 μ moles), los autores indican que estas cantidades son lo suficientemente altas para permitir una medida precisa en el cambio de los niveles de vitamina E durante el periodo postprandial en humanos (Borel y cols, 1997). Estas cantidades son muy superiores a las recomendaciones de ingesta diaria en España (12 mg/d) (Moreiras y cols, 1996; 2004) y en EEUU (15mg/día) (IOM; 2000). No obstante, el presente estudio pretendía valorar la absorción de vitaminas A y E procedentes de alimentos comercialmente disponibles y consumidos en cantidades compatibles con una dieta equilibrada. Por tanto, con

independencia de otras consideraciones metodológicas, la cantidad suministrada puede haber sido un determinante fundamental de la falta de respuesta para la vitamina E observada en el presente estudio.

En un estudio reciente en donde evalúan la biodisponibilidad de vitamina E a partir de manzanas enriquecidas con esta vitamina, utilizan cantidades de vitamina E ingeridas $\cong 22\text{mg}$ ($46\ \mu\text{moles}$ de acetato de tocoferilo marcado isotópicamente), describen porcentajes de absorción del 10, 20 y 30 % en función de la cantidad de grasa ingerida (0, 6 y 21g). Al igual que en nuestro estudio, no observan cambios significativos en el α -tocoferol en plasma total tras la cantidad ingerida e indican que sólo pueden describir la biodisponibilidad de la vitamina E a partir de las manzanas enriquecidas porque han utilizado α -tocoferol marcado, algo que consideran imperativo en estudios de biodisponibilidad de vitamina E a partir de fuentes dietéticas (Bruno y cols, 2006).

Parece evidente que las dos vitaminas no se comportan igual en la respuesta en quilomicrones. En el caso de la vitamina A la concentración máxima del palmitato de retinilo se alcanza entre las 2 y las 4 horas mientras que el α -tocoferol, según la información disponible, alcanza su concentración máxima a partir de las 4 horas después de la ingesta (Sokol, 1996; Borel y cols, 1997; Cohn, 1997; Lodge y cols, 2004; Jeanes y cols, 2005) estando descrito que, con cantidades ingeridas similares a las utilizadas en nuestro estudio, la concentración máxima se alcanza $\cong 9\ \text{h}$ (Bruno y cols, 2006). Este tiempo de retraso en la aparición de vitamina E en quilomicrones comparado con la vitamina A, sugiere que la cinética de absorción de la vitamina E es diferente a la de vitamina A, quizás porque el transporte del α -tocoferol en el enterocito es menos eficiente que el de la vitamina A (Borel y cols, 2001). En nuestro estudio, no se obtuvo respuesta a lo largo de las 6 horas ensayadas,

ni tampoco los resultados indicaban una tendencia clara al aumento de concentración del α -tocoferol en TRL durante este tiempo aunque no se puede afirmar que no existiera un incremento más tardío puesto que no se tomaron muestras posteriormente.

El análisis del suero en los distintos tiempos coincidió cualitativamente con los resultados descritos del análisis de la fracción de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL). En el caso de la vitamina A, la respuesta evaluada como la cantidad de ésteres de retinilo totales presente en el suero tras ingerir los tres tipos de leche fue aproximadamente el doble de la observada en TRL. Teóricamente, los resultados obtenidos mediante el análisis de los dos tipos de muestra debería haber sido muy similar pero, sin embargo, esto no ocurrió así. En ambos casos, los análisis se realizaron con el mismo método (extracción y análisis por HPLC y participación en programas de control de calidad) cuyo error analítico es $< 10\%$ para el retinol, $< 5\%$ para el tocoferol y $< 3\%$ para el palmitato de retinilo, por lo que estas diferencias no son explicables por errores analíticos. Estas discrepancias pueden ser explicadas por problemas en el aislamiento de la fracción TRL o de estabilidad de los analitos en esta matriz rica en lípidos durante el periodo post-prandial (tiempo y temperatura de almacenaje hasta la separación de la fracción a analizar). Así, tomando como referencia los datos obtenidos en suero, una explicación plausible es que haya habido una separación incompleta de las fracciones TRL, dado que se obtuvo sistemáticamente una menor cantidad de vitamina A cuando analizamos esta fracción, independientemente del tiempo evaluado, el sujeto o el tipo de leche ensayado.

Algunos autores indican que la cantidad y tipo de grasa ingerida (disponible para el transporte de compuestos liposolubles) influye en la composición y otras propiedades físicas (densidad y tamaño) de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (QM) (Lewis y cols, 1973,

Bysted y cols, 2005; German & Dillard, 2006).

Respecto al tamaño de los quilomicrones, está descrito que tienen mayor tamaño cuando la dieta contiene ácidos grasos insaturados que cuando son saturados (Segura, 1988; Berr, 1992). En nuestro estudio, quizás la cantidad de grasa ingerida en el desayuno con las leches enteras (20,8g) fuera pequeña y con una cantidad de grasa ingerida mayor (~40 - 100g) hiciera que se diferenciara mejor los dos tipos de lipoproteínas QM (de origen intestinal) y VLDL (de origen hepático) (Lewis y cols, 1973).

En cuanto a la vitamina E, en el periodo postprandial, el α -tocoferol es transportado por quilomicrones y una vez en el hígado es liberado al torrente sanguíneo mediante las lipoproteínas de muy baja densidad hepáticas (VLDL), circulando fundamentalmente ligado a LDL y siendo captado por los diferentes tejidos. Aunque en el periodo postprandial las vitaminas A y E se incorporan en quilomicrones, el α -tocoferol puede ser transferido a otras lipoproteínas, algo que no ocurre con el palmitato de retinilo y que puede explicar, en parte, la ausencia de respuesta observada tras la ingesta de vitamina E en este estudio, dado que la fracción aislada no debería contener cantidades significativas de otras lipoproteínas. En cualquier caso, esta transferencia entre lipoproteínas durante el periodo post-prandial no explica la ausencia de respuesta observada en suero.

Son muchas las referencias que existen sobre estabilidad en el tiempo de la vitamina A (all-trans-retinol) y vitamina E (α , γ , y δ -tocoferol) y β -caroteno en suero y plasma, pero no en TRL antes de su separación. En el presente estudio, para los análisis en suero y plasma se tuvo en cuenta la información sobre estabilidad aportada en estudios relevantes (Driskell y

cols, 1985; Comstock y cols, 1993; WHO, 2002). En diversos estudios, en general posteriores a nuestros análisis de vitaminas en TRL, se indica el almacenamiento de muestras de TRL aisladas a - 70 °C durante periodos de tiempo variables (no especificados) para el posterior análisis de vitaminas, pero sin mencionar la estabilidad (van Vliet y cols, 1995; van het Hof y cols, 2000b; Cardinault y cols, 2003; Faulks y cols, 2004, Pérez-Martínez y cols, 2004; Agren y cols, 2005).

6.2.3. Absorción relativa de las vitaminas.

El término de biodisponibilidad incluye los conceptos de bioaccesibilidad, absorción, transporte, distribución y almacenamiento del compuesto y son muchos los factores que pueden influir sobre este proceso. Unos factores están relacionados con el alimento (efecto de la matriz, cantidad de grasa, uniones moleculares, cantidad de nutriente ingerida, formas químicas del nutriente) y otros factores están asociados al sujeto (estatus nutricional, edad, hábitos como el consumo de tabaco, alcohol, etc) (van den Berg, 1993; de Pee & West, 1996; Traber, 1997; Biesalski, 1997; Castenmiller & West 1998; Jeanes y cols, 2002, 2004; Borel y cols, 2003). En concreto, el presente estudio valoró la absorción relativa respecto a una cantidad ingerida y durante un período de tiempo previamente definido. Por tanto, dentro del contexto de la biodisponibilidad, evaluamos las dos primeras fases conjuntamente, es decir, la disponibilidad de las vitaminas para la absorción a partir de la leche (bioaccesibilidad) y la absorción intestinal (Stahl y cols, 2002).

Son muy pocos los estudios de biodisponibilidad de vitaminas a partir de lácteos y sólo respecto a algunas vitaminas (en concreto, la vitamina B12 -Russel y cols, 2001- el ácido

fólico -de Jong y cols, 2005- y la vitamina D - Johnson y cols, 2005). En este sentido, los resultados obtenidos en nuestro estudio son relevantes, en especial por haber utilizado leches disponibles en el mercado y en cantidades compatibles con una dieta variada, y aportan datos sobre vitaminas que no han sido descritos hasta ahora. Los resultados obtenidos muestran porcentajes de absorción muy variables, entre el 8 y el 41%, para la vitamina A, pero en cualquier caso, inferiores a los porcentajes de absorción de esta vitamina a partir de cápsulas, que en función de la grasa ingerida, está alrededor del 70% (Berr & Kern, 1984; Biesalski, 1991; Blomhoff, 1994; IOM, 2001). En el presente estudio, la ausencia de respuesta en vitamina E impide valorar su porcentaje de absorción a partir de la leche aunque, en estudios utilizando vitamina E en cápsulas, los porcentajes de absorción se encuentran entre el 10 y 95% (Cohn, 1997; Roodenburg y cols, 2000; Hayes y cols, 2001; Stahl y cols, 2002). Este rango tan amplio puede ser atribuido a la variedad de condiciones experimentales y métodos utilizados, lo cual dificulta la comparación cuantitativa (Cohn, 1997).

6.2.3.1.- Factores condicionantes de la absorción asociados al alimento.

Los menores porcentajes de absorción que se obtienen al ingerir vitaminas a partir de alimentos pueden deberse a la menor accesibilidad de las vitaminas en alimentos, posiblemente en relación con la estructura de la matriz alimentaria (Brown y cols, 1989). Hay que tener en cuenta que la absorción de nutrientes a partir de alimentos implica la ingesta y metabolismo de otros componentes de los alimentos presentes de forma simultánea (Borel y cols, 2001) y, en este sentido, hay muchos factores que pueden influir en la absorción de dichas vitaminas a partir del mismo alimento (ej. posibles interacciones entre los dos

sustratos, competición por enzimas, o por los mecanismos de entrada al enterocito) (Lodge y cols, 2004; Debier y Larodelle, 2005), así como para la misma vitamina a partir de distintos alimentos (Lodge y cols, 2004).

Otro de los factores que puede influir en la absorción de vitaminas, es la *cantidad ingerida* (de Pee & West, 1996; Biesalski, 1997; Granado-Lorencio & Olmedilla-Alonso, 2003). El diferente contenido de vitaminas A y E en las leches estudiadas determina la cantidad que los sujetos ingirieron, dado que estos tomaron en los tres estudios el mismo volumen de leche (430 ml) puede afectar, en parte, a la variabilidad en las respuestas de los sujetos. Así, la respuesta de vitamina A (AUC de ésteres de retinilo) en suero o en TRL estaba en relación con la cantidad de vitamina A ingerida, independientemente del contenido graso de la leche ensayada.

Se ha descrito una proporcionalidad entre dosis y absorción cuando la cantidad ingerida es baja (Parker, 1997), aunque también la cantidad de vitaminas ingeridas puede influir en la absorción relativa, debido a variaciones en la incorporación micelar, el volumen de translocación intracelular y la incorporación a quilomicrones (Parker, 1997; Bowman & Russell, 2003; Borel, 2003). No obstante, en nuestro estudio, la cantidad de vitamina A ingerida (0,48 - 4,15 μ moles = <1,2mg) no parece haber sido un factor determinante de la biodisponibilidad, ya que con las cantidades de vitamina ingeridas no hubo diferencias en los porcentajes de absorción.

Como ya se ha comentado, en cuanto a la vitamina E, la cantidad proporcionada (0,41-32,49 μ moles = <14mg) fue insuficiente para provocar una respuesta evaluable. En otros estudios en humanos está descrito un incremento de vitamina E en quilomicrones tras la ingesta de cantidades de 300 μ moles (150mg) y superiores (432 y 937 mg de acetato de

tocoferilo) (Borel y cols, 1997; Jeanes y cols, 2004) obteniéndose, con las dosis más elevadas, concentraciones máximas de α -tocoferol en quilomicrones de 6 y 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente (Borel y cols, 1997). En cualquier caso, estas cantidades son mucho mayores a las utilizadas en nuestro estudio y difíciles de alcanzar a partir de alimentos.

Por otra parte, aunque las respuestas al aporte de vitaminas A (Borel y cols, 1998; Herrero-Barbudo y cols, 2006) y vitamina E están en relación con la cantidad de nutriente ingerida (Borel y cols, 1997), este no debe ser el único factor determinante del proceso dado que la ingesta de cápsulas con cantidades de vitamina E de 150mg (300 μmoles), con leche desnatada o agua no provoca ninguna respuesta en las concentraciones de α -tocoferol (marcado) en quilomicrones (Jeanes y cols, 2004), lo que pone de manifiesto que hay otros factores (ej. cantidad de grasa) que también están influyendo en la absorción.

El efecto de la *grasa de la dieta* sobre la biodisponibilidad de vitaminas liposolubles ha sido discutido por numerosos autores (Roodenburg y cols, 2000; Guerci y cols, 2001; Stahl y cols, 2002; Borel, 2003). La grasa proporciona un ambiente hidrófobo que favorece la solubilidad de estos compuestos, estimula la secreción de sales biliares, aumenta la solubilidad de estos compuestos en micelas y proporciona componentes útiles para el ensamblaje de quilomicrones (Borel, 2003). Sin embargo, la cantidad necesaria para asegurar la absorción de vitaminas liposolubles puede ser bastante pequeña (Stahl y cols, 2002) ya que con cantidades de grasa de 3 g se obtiene una respuesta de α -tocoferol en plasma igual que administrando 36 g de grasa (Roodenburg y cols, 2000; Jeanes y cols, 2004) o incluso, no limitante en la absorción de vitamina E (Hayes y cols, 2001). En el presente estudio, la cantidad de grasa ingerida en cada ensayo, entre 6,2 y 20,8 g. aportadas por la leche desnatada y la entera (y entera enriquecida), no parece haber influido en la cantidad de vitamina A

absorbida ya que el porcentaje de absorción fue similar en los tres casos, por lo que la grasa no parece ser un factor determinante de la absorción en este estudio, al menos en el rango de grasa aportado.

Otro aspecto que afecta la biodisponibilidad de vitaminas A y E son las *interacciones* con otros componentes de los alimentos (ej. en este estudio las leches contenían vitaminas A, D, E, ácido fólico, Ca y P). La ausencia de respuesta del α -tocoferol en suero y en TRL en nuestro estudio podría estar relacionada también con la presencia de interacciones entre ambas vitaminas y/o con otros componentes del alimento lo que podría afectar su absorción y biodisponibilidad (Sandstrom y cols, 2001). Así, está descrito que la ingesta conjunta de vitaminas A y E en elevada cantidad aumenta la absorción de la vitamina A (Biesalski, 1997) y que el α -tocoferol ejerce una influencia sobre la biodisponibilidad de vitamina A en cuanto a la distribución de los ésteres de retinilo en tejidos (dependiendo del tejido, estimula o inhibe la hidrólisis del palmitato de retinilo) (Napoli y cols, 1984). Asimismo, los ésteres de retinilo (acetato y palmitato) y el éster de tocoferilo podrían competir por la enzima que hidroliza estos ésteres o quizás por los mecanismos de entrada al enterocito, como está descrito en terneros y pollos (Eicher y cols, 1997; Debier y Larondelle, 2005). Algunos autores han descrito en ensayos de digestión *in vitro* que la presencia de acetato de retinilo en el ensayo mostraba una inhibición no competitiva del acetato de tocoferilo con la colesterol esterasa en la hidrólisis del acetato de tocoferilo (Lauridsen y cols, 2001). En este sentido, en nuestro laboratorio, hemos realizado recientemente digestiones *in vitro* (Granado-Lorencio y cols, 2007) que mostraron una hidrólisis incompleta del acetato de tocoferilo presente en leches enriquecidas, resultados que son consistentes con mecanismos de competición enzimática descritos. Por ello, una menor hidrólisis del acetato de tocoferilo implicaría que la cantidad de

α -tocoferol libre disponible para ser absorbida sería menor y esto reduciría la respuesta postprandial.

6.2.3.2.- Factores condicionantes de la absorción asociados al sujeto.

La variación en la absorción de vitamina A, tanto intra-sujeto para los tres tipos de leche ($31,3 \pm 14 \%$; $IC_{95\%}$: 24,3 y 38,3) como entre-sujetos (55% en leche entera, 41% y 43% en leche entera enriquecida y desnatada enriquecida, respectivamente), fue elevada y puede estar condicionada no sólo por los factores asociados al alimento y anteriormente descritos, sino también por diversos factores asociados al sujeto, entre los que se encuentran el sexo, la edad, el estado fisiológico y el nutricional.

Los voluntarios participantes en este estudio tenían unas características de edad, sexo y estado nutricional homogénea al inicio de los tres ensayos. Aunque hay autores que indican que el estatus nutricional del sujeto puede afectar la biodisponibilidad de un micronutriente (Jackson, 1997), no necesariamente tiene que influir en el proceso de absorción (incorporación a micelas, entrada al enterocito, en quilomicrones o vertido a torrente sanguíneo) (van den Berg y cols, 1993; Biesalski, 1997; Borel, 2003) aunque sí influiría en su utilización por el organismo (van den Berg, 1993, Lodge y cols, 2004). Por ejemplo, la conversión de β -caroteno a retinoides depende del estatus nutricional preexistente de vitamina A, aumentando la conversión durante estados de deficiencia de vitamina A (van den Berg, 1993). En este estudio, los niveles de vitaminas A y E requeridos como criterios de inclusión (retinol $>30 \mu\text{g/dl}$; α -tocoferol $> 700 \mu\text{g/dl}$ y α -tocoferol / colesterol total $> 2,5$) indicaban niveles de reserva hepática de vitamina A adecuados (Underwood, 1984) y también niveles

circulantes adecuados de vitamina E (Thurnham y cols, 1986; Machlin, 1991), por lo que estos factores no habrían condicionado la biodisponibilidad en el estudio.

Asimismo, aunque en este estudio no se determinaron los niveles de triglicéridos durante el periodo postprandial, algunos autores indican que existe una relación lineal entre los niveles de triglicéridos en ese periodo postprandial y la respuesta de ésteres de retinilo en TRL (Biesalski, 1997). De esta forma, la variabilidad de respuesta postprandial obtenida entre sujetos, en nuestro estudio, se podría relacionar con la variabilidad en la respuesta lipídica postprandial, generalmente mayor que la observada en situación de ayuno, la cual parece estar modulado por factores ambientales y genéticos (ej. polimorfismos) (Pérez-Martínez y cols, 2004; Agren y cols, 2006).

6.3. Valoración de los diferentes métodos de cálculo de porcentajes de absorción de vitamina A durante el periodo postprandial.

En el estudio de absorción de vitamina A durante el periodo post-prandial, se evaluó el valor de predicción que presenta el cálculo del AUC utilizando sólo 3 tiempos (AUCp, predictivo) frente al AUC convencional utilizando 7 tiempos (AUCc, convencional) (Guerci y cols, 2001), comprobándose que ambos procedimientos muestran buena correlación (Pearson: $r > 0,81$; $p < 0.001$). Además, mediante análisis de regresión lineal, se comprobó la intercambiabilidad de ambas variables (AUCp y AUCc) observándose que el AUC de predicción proporciona una información similar (clasificación de sujetos o tipo de leche en función de su absorción). De esta forma, al distribuir los sujetos en función de su absorción calculada con las AUCc y AUCp, el 90% de los sujetos quedaban clasificados dentro de los

mismos cuartiles o cuartiles adyacentes y, en este sentido, la utilización de 3 puntos para el cálculo de la respuesta y la absorción relativa puede ser una alternativa fiable en estudios de biodisponibilidad en humanos. Otras implicaciones de este abordaje incluyen la reducción en el número de extracciones que hace que el estudio sea menos invasivo, la disminución del número de determinaciones con la consiguiente reducción de gastos (solventes, reactivos, personal,...) y la posibilidad de manejar y evaluar un mayor número de participantes. No obstante, la aplicabilidad del AUCp a otros componentes de la dieta (ej. vitamina E, carotenoides) debería ser confirmada mediante otros estudios bien controlados en cuanto a puntos de mayor absorción y tiempo de recuperación a nivel basal, entre otros.

Por otro lado, la utilización de un único punto, coincidente con la $C_{m\acute{a}x}$. (Barua, 1999), nos permitió comparar respuestas relativas entre tipos de leche y entre sujetos, aunque el porcentaje de absorción calculado era alrededor del 25% del obtenido con el método convencional (AUCc), tomado como referencia. Aunque este procedimiento no permite estimar la absorción “real”, permite estudiar respuestas relativas de forma más rápida y económica así como su aplicación en grupos más amplios de la población.

6.4. Relevancia nutricional y aplicabilidad.

La relevancia de los datos generados con el presente estudio es básicamente de dos tipos, se aporta información sobre el contenido (y variabilidad) de vitaminas A y E en leches, enriquecidas o no, comercializadas y de amplio consumo en la población española, así como también información sobre su grado de absorción en sujetos control jóvenes.

El contenido de vitaminas A y E en leches (Herrero, 2003; Herrero-Barbudo y cols, 2005), entre otros, se ha aportado para su inclusión en la primera Tabla y Base de Datos de Composición de Alimentos Españoles, elaborada con alimentos españoles analizados en España y dentro del marco del proyecto EuroFir. Esta Tabla será mantenida y actualizada, tras la finalización del proyecto, por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

Aunque recientemente Flynn y cols,(2003) indican que la adición de vitaminas a los alimentos se puede realizar en un amplio rango de forma segura alcanzado niveles nutricionalmente relevantes, el hecho es que hasta ahora las tablas de composición de alimentos no han incluido el contenido de alimentos enriquecidos estimado mediante análisis específicos (aunque sí, el contenido en la etiqueta nutricional) por lo que la información que aportamos puede contribuir a una mejor estimación de las ingestas diarias adecuadas, recomendaciones y niveles de seguridad en la ingesta.

En condiciones normales, una dieta variada proporciona todos los nutrientes necesarios para el normal desarrollo y mantenimiento de un organismo sano, siempre y cuando se ingieran en las cantidades adecuadas. Sin embargo, en determinadas etapas o situaciones de la vida el requerimiento de algunos micronutrientes es mayor (p.e. ancianos, niños, embarazo y lactancia, diversas patologías) y, en este contexto, los alimentos con vitaminas añadidas presentan mayor densidad y por tanto, constituyen una mejor fuente de nutrientes que los tradicionales y contribuyen positivamente a la ingesta de micronutrientes (Berner y cols, 2001; Dary & Mora, 2002; Herrero y cols, 2002).

Por otra parte, la reducción en el consumo de energía que se ha producido en la mayoría de países desarrollados paralelamente a una disminución de la actividad física,

conlleva una menor ingesta de micronutrientes que podría ser compensada a través del consumo de alimentos con mayor densidad nutricional. En este sentido, la leche parcial o totalmente desnatada enriquecida con vitamina A y E aporta mayor cantidad de vitaminas liposolubles que la leche entera tradicional sin aporte de grasa, y esto puede ser una alternativa interesante para aquellas personas que no quieran aumentar su ingesta calórica sin afectar el porcentaje de absorción de la vitamina A, según se ha descrito en el presente estudio.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

En base al estudio de análisis de formas químicas y contenido de vitaminas A y E en leche enriquecida (con distintos porcentajes de grasa) comercializadas:

1.- El contenido de vitaminas A (retinol, palmitato de retinilo, acetato de retinilo, β -caroteno) y E (α -tocoferol, acetato de tocoferilo) de las leches enriquecidas, difiere (tanto por exceso, como por defecto) del referenciado en la etiqueta, pero todas las marcas cumplían la normativa española y europea (RD 1275/2003 y CE, 1925/2006).

En cuanto a la biodisponibilidad de vitaminas A y E a partir de leche entera y enriquecidas (entera y desnatada) en sujetos control:

2.- El porcentaje de absorción de la vitamina A a partir de los distintos tipos de leche es similar (30 - 34%), independientemente de la presencia de algunos factores modificadores de la absorción como son el contenido graso del alimento, la cantidad y forma química de nutriente ingerida (en el rango de ingesta evaluado).

3.- La valoración de la biodisponibilidad de vitamina A mediante la utilización de la respuesta en 3 tiempos en vez de 7 durante el periodo postprandial, permite la intercambiabilidad de ambos protocolos y que se pueda considerar su utilización en estudios de biodisponibilidad de compuestos similares en el futuro.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

Agren, J.J; Hallikainen, M; Widgren, H; Miettinen, T.A; Gylling, H. Postprandial lipemic response and lipoprotein composition in subjects with low or high cholesterol absorption efficiency. Clin. Chim. Acta. 366 (1-2): 309-315, 2006.

Agren, J.J; Valve, R; Vidgren, M.L. Uusitupa, M. Postprandial lipemic response is modified by the polymorphism at codon 54 of the fatty acid-binding protein 2 gene. Arterioscl. Throm Vas. 18(10): 1606-1610, 1998.

AOAC. Vitamins and other nutrients En: Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17^a Ed. Helrich, K; Arlington, VA . Cap. 45, 2000.

Ball, G.F.M. Bioavailability and Analysis of vitamins in Food: Vitamin A and the provitamin A carotenoids. Chapman & Hall (Ed) 115-154, 1998

Baro, L; Fonollá, J; Peña, J.L.; Martínez-Pérez A; Lucena, A; Jiménez, J; Boza, J.J. n-3 Fatty acids plus oleic acid and vitamin supplemented milk consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans. Clin Nutr, 22(2): 175-182, 2003.

Barua, A.B. Intestinal absorption of epoxy- β -carotenes by humans. *Biochem J.* 339, 359-362, 1999.

Barr, S.I; Mc Carron, D.A. Effects of increased consumption of fluid milk on energy and nutrient intake, body weight, and cardiovascular risk factors in healthy older adults. *J Am Diet Assoc.* 100(7):810-817, 2000.

Bender, A.E. "Nutritional significance of bioavailability". En *Nutrient availability: Chemical and Biological Aspects.* Southgate, D; Johnson, I; Fenwick, GR (Eds) Royal Society of Chemistry, 3-9, 1989.

Bendich, A; Olson, JA. Biological actions of carotenoids, *FASEB J*, 3 1927-1932, 1989.

Berner LA; Clydesdale, FG; Douglass JS Fortification contributed greatly to vitamin and mineral intakes in the United States, 1989-1991. *J Nutr.*, 2177-2183, 2001.

Berr, F y Kern, F. Plasma clearance of chylomicrons labeled with retinyl palmitate in healthy human subjects. *J. Lipid Res.* 25:805-812, 1984.

Berr, F Characterization of chylomicron remnant clearance by retinyl palmitate label in normal humans. *J. Lipid Res.* 33-930, 1992.

Biesalski, HK. Bioavailability of vitamin A. Eur J Clin Nutr. 51 Suppl, S71-S75, 1997.

Bland, J.M y Altman, D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. The lancet, 8: 307-310, 1986.

Blomhoff, R Overview of vitamin A metabolism and function. En Vitamin A in health and disease .Blomhoff, R. (Ed). Marcel Dekker, New York. 1-37, 1994.

Borel, P; Mekki, N; Boirie, Y; Partier, A; Grolier, P; Alexandre-Gouban, MC; Beaufre, B; Armand M, Lairon D, Azais-Braesco, V. Postprandial chylomicron and plasma vitamin E responses in healthy older subjects compared with younger ones. Eur. J. Clin. Invest 27: 812-821, 1997.

Borel, P; Mekki, N; Boirie, Y; Partier, A; Grolier, P; Alexandre-Gouban, MC; Beaufre, B; Armand M, Lairon D, Azais-Braesco, V. Comparison of the posprandial plasma vitamin A response in young and older adults. J. Gerontol. A Biol, 53: B133-B140, 1998.

Borel, P; Pasquier, B; Armand, M; Tyssandier, V; Grolier, P; Alexandre-Gouba, MC; Andre, M; Senft, M; Peyrot, J; Jaussan, V; Lairon, D; Azais-Braesco, V. Processing of vitamin A and E in the human gastrointestinal tract. Am J Physiol Gastr L. 280: G95-G103, 2001.

Borel, P. Factors Affecting Intestinal Absorption of Highly Lipophilic Food Microconstituents (Fat-soluble vitamins, Carotenoids and Phytosterols). Clin. Chem. Lab.

Med.; 41 (8): 979-994, 2003.

Briend, A. Highly nutrient-dense spreads: a new approach to delivering multiple micronutrients to high –risk groups. *Brit. J. Nutr.*, 85 Suppl 2. S175-S179, 2001.

Brinkman, E; Oei, H.B; Melhlitz, I; Tiebach, R; Dehne, L; Baltes, W. Vitamin A in liver and milk and its behaviour during different heating process. En *Bioavailability'93: Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient bioavailability*. Schlemmer, U. (de) 2^a Parte, 357-361, 1993.

Brown, ED; Micozzi, MS; Craft, NE; Bieri, JG; Beecher, G. Plasma carotenoids in normal men after a single ingestion of vegetables or purified β -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49:339-45, 1989.

Brown, MJ; Ferruzzi, MG; Nguyen, ML; Cooper, DA; Eldridge, AL; Schwartz, SJ; White, WS. Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection, *Am. J. Clin. Nutr.*, 80: 396-403, 2004.

Bruno, RS; Leonard, SW; Park, SI; Zhao, Y; Traber, MG. Human vitamin E requirements assessed with the use of apples fortified with deuterium-labeled α -tocopheryl acetate. *Am. J. Clin. Nutr.*, 83: 299-304, 2006.

Bysted, A; Holmer, G; Lund, P; Sandström, B; Tholstrup, T. Effect of dietary fatty acids on the postprandial fatty acid composition of triacylglycerol-rich lipoproteins in healthy male subjects. *Eur. J. Clin Nutr.* (59) 24-34, 2005.

Cardinault, N; Tyssandier, V; Grolier, P; Winklhofer-Roob, B.M.; Ribalta, J; Bouteloup-Demange, C; Rock, E; Borel, P. Comparison of the postprandial chylomicron carotenoid responses in young and older subjects. *Eur. J Nutr.* 42:315-323, 2003.

Castenmiller, J.J.M; West, C.E. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annu. Rev. Nutr.* 18: 19-38, 1998.

Chase, GW; Long, AR. Liquid chromatographic method for analysis of all-rac- α -tocopheryl acetate and retinyl palmitate in milk-based infant formulae using matrix solid phase dispersion *J. AOAC Int.*, 81 (3): 582-586, 1998.

Chow, CK. Vitamin E en *Handbook of Vitamins*: Rucker, RB; Suitte, JW; McCormich, Mc; Machlin, LJ (eds) Ed. L.J. Machlin. Cap. 4, 165-198, 2001.

Código Alimentario. Boletín Oficial del Estado, Madrid 1991.

Cohn, W. Bioavailability of vitamin E. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51, Suppl. S80-S85, 1997.

Comstock, GW; Alberg, AJ; Helzlsouer, KJ. Reported effects of long-term freezer storage on concentrations of retinol, beta-carotene and alpha tocopherol in serum or plasma summarized. Clin. Chem. 39 (6), 1075-8, 1993.

Coulter, S.T & Thomas, E.L. Enrichment and Fortification of Dairy Products and Margarine. J. Agr. Food Chem. 16 158-162, 1968.

Craft, NE. Innovative Approaches to Vitamin A Assessment. J. Nutr. 131: 1626-1630, 2001.

Dary, O; Mora, JO. Food fortification to reduce vitamin A deficiency: international vitamin A consultative group recommendations. J. Nutr. 132: 2927S-2933S, 2002.

Debier, C & Larondelle, Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. J. Nutr. 93, 153-174, 2005.

De Jong, R.J; Verwei, M; West, C.E; Van Vliet, T; Siebelink, E; Van den Berg, H; Castenmiller, J.J. Bioavailability of folic acid from fortified pasteurised and UHT-treated milk in humans. Eur. J. Clin Nutr. 59 (8): 906-913, 2005.

De Pee S; West CE. Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: A review of the literature. Eur J Clin Nutr. 50 (Suppl. 3) S38-S53, 1996.

De Ritter, R; Purcell, A.E. En Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. Bauerfeind, J.C (ed). Academic Press. London, 883-916, 1996.

Diplock, AT; Aggett, PJ; Ashwell, M; Bornet, F; Fern, EB; Roberfroid, M Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. Brit. J. Nutr., 81; S1, 1999.

Driskell, WJ; Lackey, AD; Hewett, JS; Bashor, MM. Stability of vitamin A in frozen sera. Clin. Chem. 31 (6), 871-2, 1985.

Eicher, S.D; Morrill, J.L; Velazco, J. Bioavailability of α -tocopherol fed with retinol and relative bioavailability of D- α -tocopherol or DL- α -tocopherol acetate. J Dairy Sci, 80:393-399, 1997.

Fairfield, KM; Fletcher, RH. Vitamins for Chronic Disease Prevention in Adults. JAMA, 287 (23):3116-3126, 2002.

FAO. Nutrición Humana en el Mundo en Desarrollo. Carne, pescado, huevos, leche y productos derivados, <http://www.fao.org> (consultada el 21/09/2006)

Faulks R.M; Hart, D.J.Brett, G.M; Dainty J.R; Southon, S. Kinetics of gastro-intestinal transit and carotenoid absorption and disposal in ileostomy volunteers fed spinach meals. Eur. J. Nutr. 43: 15-22, 2004.

Faulks, R.M; Southon, S. Challenges to understanding and measuring carotenoids bioavailability. *Biochim.Biophys.Acta*, 1740, 95-100, 2005.

Finglas, PM; Van den Berg, H; de Froidmont-Görtz I. Improvements in the determination of vitamins in foods: method intercomparison studies and preparation of certified reference materials (CRMs) *Food Chem.* 57: 91-94, 1996.

Flynn, A; Moreiras, O; Stehle, P; Fletcher, RJ; Müller, DFG; Rolland, V. Vitamins and minerals: A model for safe addition to foods. *Eur. J Nutr.* 42: 118-130, 2003.

Geigy, J.R. Cientific tables. Konrad Diem (ed) 547-548, 1962.

German, J.B. & Dillard, C.J. Fractionated milk fat composition, structure and functional properties. *Food Technol.* 52: 33-38, 1998.

German, J.B; & Dillard, C.J. Composition, Structure and Absorption of Milk lipids: A Source of Energy, Fat-Soluble Nutrients and Bioactive Molecules. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*; 46: 57-92, 2006.

Gomis, DB; Fernández, MP; Gutierrez-Álvarez, MD. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 891(1): 109-114, 2000.

Granado, F; Olmedilla, B; Blanco, I; Rojas-Hidalgo, E. An improved HPLC method for the separation of fourteen carotenoids, including 15-/13- and 9 cis- β -carotene isomers, phytoene and phytofluene. *J. Liq. Chromatogr.* 14 (13) 2457-2475, 1991.

Granado, F; Olmedilla, B; Blanco, I; Rojas-Hidalgo, E. Carotenoid composition in raw and cooked spanish vegetables. *J. Agric and Food Chem.*, 2135-2140, 1992.

Granado, F; Olmedilla, B; Blanco, I; Rojas-Hidalgo, E. Major fruit and vegetable contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 50 (4): 246-250, 1996.

Granado Lorenzo, F. Status nutricional de carotenoides, retinol y tocoferoles en la diabetes mellitus insulín-dependiente. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 1998.

Granado, F; Olmedilla, B; Gil-Martínez, I; Blanco, I; Millan, I; Rojas-Hidalgo, E; Carotenoids, retinol and tocopherols in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and their immediate relatives. *Clin. Sci.* 94, 189-195, 1998.

Granado-Lorenzo, F. y Olmedilla-Alonso, B. Bioavailability of vitamins: Bioavailability of Micronutrients and Minor Dietary Compounds. *Metabolic and Technological Aspects.* Vaquero, P; García-Arias, T; Carvajal, A; Sánchez-Muñiz, F.J. (Eds) 19-30, 2003.

Granado, F; Olmedilla, B; Blanco, I; Herrero, C. Valoración del estado nutricional mediante la determinación de retinol y α -tocoferol en gotas de sangre secas. *Quim Clin* 23 (3) 121-126, 2004.

Granado-Lorencio, F; Olmedilla-Alonso, B; Herrero-Barbudo, C; Blanco-Navarro, I; Pérez-Sacristán, B; Blázquez-García, S. In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruit and vegetables. *Food Chem.* 102, 641-648, 2007.

Granado, F; Blázquez, S; Olmedilla, B. Changes in carotenoid intake from fruit and vegetables in the Spanish population over the period 1964-2004. *Public Health Nutr.* DOI 10.1017/S136890007662314, Online Feb. 2007

Griffths, A. J., Humphreys, SM., Clark, M.L., Fielding, B.A. & Frayn, K. Immediate metabolic availability of dietary fat in combination with carbohydrates *Am. J. Clin. Nutr.*, 59: 53-59, 1994.

Guerci, B; Paul, J.L; Hadjadj, S; Durlach, V; Verges, B; Attia, A; Girard-globa, A; Drouin, P. Analysis of the postprandial lipid metabolism: Use of a 3-point test. *Diabetes metab*, 27: 449-457, 2001.

Harrison, E.H. Lipases and carboxylesterases: Possible roles in the hepatic Metabolism of Retinol. *Annu rev. Nutr.* 18:259-76, 1998.

Harrison, E.H; Hussain, M. Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. J. Nutr. 131: 1405-1408, 2001.

Harrison, E. H. Mechanism of digestión and absoption of dietary vitamin A. Annu. Rev. Nutr. 25: 87-103, 2005.

Hayes, K.C; Pronczuk, A; Perlman, D. Vitamin E in fortified cow milk uniquely enriches human plasma lipoprotein. Am. J. Clin. Nutr. 74: 211-218, 2001.

Herrero, C. Determinación de vitaminas A, E y carotenoides en leche y productos lácteos. Diploma de Estudios Avanzados. Universidad Autónoma de Madrid, 2003.

Herrero, C; Granado, F; Blanco, I; Olmedilla, B. Vitamin A and E content in dairy products: their contribution to the recommended dietary allowances (RDA) for elderly people J. Nutr. Health & Ageing 6(1): 57-59, 2002.

Herrero-Barbudo, M.C. Granado-Lorencio, F; Blanco-Navarro, I; Olmedilla-Alonso, B. Retinol, α - and γ .tocopherol and carotenoids in natural and vitamina A-and E- fortified dairy products commercialized in Spain. Int. Dairy J. 15: 521-526, 2005.

Herrero-Barbudo, M.C; Olmedilla-Alonso, B; Granado-Lorencio, F; Blanco-Navarro, I; (2006) Bioavailability of vitamins A and E from whole and vitamin-fortified milks in control subjects. Eur. J. Nutr. 45:391-398, 2006.

Hicks, T; Hansen, A.P. Rushing, J.E. Procedures Used by North Carolina Dairies for vitamins A and D fortification of milk. J. Dairy Sci, 79: 329-333, 1996.

Hinrichs, J. Mediterranean milk and milk products. Eur J Nutr 43 Suppl 1:112-117, 2004.

Hite, D.A. Determination of retinyl palmitate (vitamin A) in fortified fluid milk by liquid chromatography: collaborative study. J AOAC Int. 86, 82: 375-386, 2003.

Holden, J.M; Eldridge, AL; Beecher, GR; Buzzard, M; Bhagwat, S; Davis, CS; Douglass, LW; Gebhart, S; Haytowitz, D; Schakel, S. Carotenoid content of U.S. Foods: An update of the database. J. Food Compos. Anal., 12:169-196, 1999.

Hosomi, A; Arita, M; Sato, Y; Kiyose, C; Ueda, T; Igarashi, O; Arai, H; Inoue, K. Affinity for α -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin analogs. FEBS Letters 409: 105-108, 1997.

Indyk, H.E; Lawrence, R; Broda-Angel, D. The micronutrient content of bovine whole milk powder: Influence of pasture feeding and season. Food Chem. 46: 389-396, 1993.

Institute of Medicine. National Academy of Sciences. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and carotenoids. National Academy Press, Washington D.C (USA), 2000.

Institute of Medicine. National Academy of Sciences. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. National Academy Press, Washington D.C (USA), 2001.

IVACG. International Vitamin A Consultive Group. Acuerdos de Annecy para la apreciación y el control de la deficiencia de vitamina A, 2003.

<http://www.ivacg.ilsa.org/life/Annecy%20span.pdf> (consultado junio 2005).

Jalal, F; Nesheim, M.C; Agus, Z; Sanjur, D; Habicht, J.P. Serum retinol concentrations in children are affected by food sources of β -carotene, fat intake, and anthelmintic drug treatment. Am J Clin Nutr. 68: 623-629, 1998.

Jackson, MJ. The assessment of bioavailability of micronutrients: Introduction. Eur J Clin Nutr. 51 Suppl 1: S1-2, 1997.

Jeanes, Y.M; Hall, W.L; Ellard, S; Lee, E y Lodge, J.K. The absorption of vitamin E is influenced by the amount of fat in a meal and the food matrix. Brit. J. Nutr., 92: 575-579, 2004.

Jeanes, Y.M; Hall, W.L; Lodge, J.K. Comparative H^2 labeled α -tocopherol biokinetics in plasma, lipoproteins, erythrocytes, platelets and lymphocytes in normolipidaemic males. Brit. J. Nutr., 94: 92-99, 2005.

Jensen, R.G. Handbook of milk composition. New York: Academic Press, 1995.

Jensen S.K; Nielsen, K.N. Tocopherols, retinol, β -carotene and fatty acids in fat globule membrane and fat globule core in cows' milk. J. Dairy Res. 63-565-574, 1996.

Jesse, F Gregory III. Recent Developments in methods for the assessment of vitamin bioavailability. Food Tech (10) 230-238, 1988.

Johansson, S y Melhus, H. Vitamin A antagonizes calcium response to vitamin D in man. J. Bone Miner Res, 16 (10): 1899-1905 (abstract), 2001.

Johnson, J.L; Mistry, V.V; Vukovich, MD; Hogle-Lorenzen, T; Hollis, B.W.; Specker, B.L. Bioavailability of vitamin D from Fortified Process Cheese and Effects on Vitamin D Status in the Elderly. J. Dairy Sci. 88:2295-2301, 2005

Juarez, M. Composicion y factores de variabilidad de la leche. Alimentacion 47-55, 1985.

Keane, E. M; O'Broin, S.O. Use of folic Acid-fortified milk in the elderly population. Gerontology, 44: 336-339, 1998.

Kelleher, J y Losowsky, M.S. The absorption of α -tocopherol in man. Brit. J. Nutr. 24: 1033-1047, 1970.

Kern, F; Everson, GT. Contraceptive steroids increase cholesterol in bile: mechanisms of action. J Lipid Res, 28: 828-839, 1987.

Khachick, F; Beecher, GR; Goli, MB. Separation, identification and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. Pure Appl. Chem. 63, 71-80, 1991.

Krasinski, SD; Cohn, JS; Russel, RM; Schaefer, EJ. Postprandial Plasma Vitamin A Metabolism in Humans: A Reassessment of the Use o Plasma Retinyl esters as Markers for Intestinally Derived Chylomicrons and Their Remnants. Metabolism, 39: 357-365, 1990.

Lauridsen, C; Hedemann, S; Jensen, S.K. Hydrolysis of tocpheryl and retinyl esters by porcine carboxyl ester hydrolase is affected by their carboxylate moiety and bile acids. J. Nutr. Biochem. 12, 219-224, 2001.

Lemieux, S; Fontani, R; Uffelman K.D.; Lewis, G.F. Steiner, G. Apolipoprotein B-48 and retinyl palmitate ar not equivalent markers of postprandial intestinal lipoproteins. J. Lipid. Res., 39: 1964-1971, 1998.

Leonard, S.C.; Good, C.K.; Gugger, E.T.; Traber, M.G. Vitamin E bioavailability from fortified breakfast cereal is greater than that from encapsulated supplements. *Am. J. Clin. Nutr.*; 79: 86-92, 2004.

Lewis, B; Chait, A; February, W; Mattock, M. Functional overlap between “chylomicra” and “ very low density lipoproteins” of human plasma during alimentary lipaemia. *Atherosclerosis*, 17 455-462, 1973.

Li, E; Tso, P. Vitamin A uptake from foods. *Curr Opin Lipidol* 14: 241-247, 2003.

Liu, C.S; Glahn, R.P; Liu, R.H. Assessment of carotenoids bioavailability of whole foods using a caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion. *J. Agr. Food Chem*, 52, 4330-4337, 2004.

Lodge, J.K; Hall, W.L; Jeanes, Y.M; Proteggente, A.R. Physiological factors influencing vitamin E biokinetics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1031:60-73, 2004.

Machlin, L.J. Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects. Ed. L.J. Machlin. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1984.

Machlin, L.J. Vitamina E en Handbook of vitamins. Machlin, LJ (Ed) cap. 3 99-144, 1991.

Maiani, G; Raguzzini, A. Mobarhan, S; Ferro-Luzzi, A. Vitamin A. En Vitamin and Nutrition Research. Int. J. Vit and Nutr. Res. 252-264, 1993.

MAPA, 2004 Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
<http://www.mapa.es/es/alimentación/pags/hechosy cifras/cifras.htm>
<http://www.eurocarne.com/informes/pdf/paneldeconsumo2003.pdf>

MAPA, 2006 Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Leche y derivados lácteos. Panel de Hogares (Años 2001-2005). Evolución del consumo de leche y derivados lácteos

<http://www.mapa.es/notas/documentos/Leche%20y%20derivados2001-2005.pps>
(consultada 4/05/07)

Mardones, P y Rigotti, A. Cellular mechanisms of vitamin E uptake:relevante in α -tocopherol metabolism and potential implications for disease. J. Nutr. Biochem, 15: 252-260, 2004.

Márquez, M; Yopez, C.E; Sutil-Naranjo, R. Rincón, M. Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A. Invest. Clin. 43 : 191-204, 2002.

Merck Index . Windholz, M; Budavari, S; Blumetti, R. F. Otterbein, ES (eds) 1983

Moreiras, O; Carbajal, A; Cabrera, L. Tablas de composición de alimentos. Ediciones Pirámide, 1996.

Moreiras, O; Carvajal, A; Cabrera, L; Cuadrado, C. Ingestas recomendadas de energía y nutrientes En: Tablas de composición de alimentos. Ediciones Pirámide, 127-131, 2004.

Morrissey, PA; Sheehy, PJA; Gaynor, P. Vitamin E. En Vitamin and Nutrition Research. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 265-269, 1993.

Murphy, S.C; Whited, L.C. Rosemberry, S.C; Hammond, B.H. Bandler, D.K. y Boor, K.J. Fluid milk vitamin fortification compliance in New York State. J. Dairy Sci. 84: 2813-2820, 2001.

Napoli, J. L, McCormick, A.M. O'Meara, B Dratz, E.A. Vitamin A Metabolism: α -tocopherol modulates tissue retinol levels *In vivo*, and retinyl palmitate hydrolysis *In vitro*. Arch. Biochem. Biophys. 230 (1): 194-202, 1984.

Nayak, N; Harrison, E.H; Hussain, M.M. Retinyl ester secretion by intestinal cells: a specific and regulated process dependent on assembly and secretion of chylomicrons. J. Lipid Res. 42:272-280, 2001.

NIST (National Institute of Standard and Technology) Round Robin RR XLIX, 1998.

Nomenclature Policy: "Generic descriptions and trivial names for vitamins and related compounds" Am. J. Clin. Nutr., 49: 151-155, 1989.

Obech -Vidal, R; Mereso- Dalmau, J; Peraire-Guitart, C. Ensayos de biodisponibilidad relativa y de bioequivalencia. Establecimiento de un protocolo. Farm. Clin. 7 (6): 469-484, 1990.

Ollilainen, V; Heinonen, M; Linkola, E; Varo, P; Koivistonen, P. Carotenoids and retinoids in Finnish foods: Dairy products and eggs. J Dairy Sci. 72: 2257-2265, 1989.

Olmedilla, B; Granado, F; Blanco, I; Rojas, E; "Determination of nine carotenoids, retinol, retinyl palmitate and alpha-tocopherol in control human serum, using two internal standards" Food Chem. 45, 205-213, 1992.

Olmedilla, B; Granado, F; Blanco, I; Rojas-Hidalgo, E. Seasonal and sex-related variations in six serum carotenoids, retinol and α -tocopherol. Am J Clin Nutr, 60: 106-110, 1994.

Olmedilla B; Granado, F; Gil-Martinez, E; Blanco, I; Rojas-Hidalgo, E. Reference levels of retinol, α -tocopherol and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. Clin Chem.: 43: 6; 1066, 1071, 1997.

Olmedilla, B; Granado, F. Growth and micronutrient needs of adolescents. Eur. J. Clin Nutr. 54, suppl 1, S11-S15, 2000.

Olmedilla, B; Granado, F; Southon, S; Wright, A.J.A; Blanco, I; Gil-Martínez, E; van den Berg, H; Corridan B; Roussel, A.M. Chopra, M; Thurnham, D.I. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E and C in control subjects from five European countries. Brit. J. Nutr. 85, 227-238, 2001.

Olmedilla Alonso, B; Granado Lorenzo, F; Blanco Navarro, I. Carotenoides y salud humana. Edita: Fundación Española de Nutrición (FEN) “Serie Informes”, 2001.

Olson J. Vitamin A. en Handbook of Vitamins: Rucker, RB; Suitte, JW; McCormich, Mc; Machlin, LJ (eds) Ed. L.J. Machlin. Cap. 1, 1-50, 2001.

OMS. World Health Organization. Official Records, nº 2. p.100, 1946.

O'Neill, M.E; Thurnham, D.I. Intestinal absorption of α -carotene, lycopene and lutein in men and women following a standard meal: response curves in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction. Brit. J. Nutr. 79: 149-159, 1998.

Park, Y; Grellner, WJ; Harris, WS, Miles, JM. A new method for the study of chylomicron kinetics in vivo. Am J Phys Endocrinol Metab. 279 (6): E1258-1263, 2000.

Parker, RS. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.*, 10: 542-551, 1996.

Parker, R.S. Bioavailability of carotenoids. *Eur. J. of Clin Nutr* 51, Suppl. 1 S 86-S90, 1997.

Pérez-Martínez, P; López-Miranda, J; Ordovás, JM; Bellido, C; Marín, C; Gomez, P; Paniagua, JA; Moreno, JA; Fuentes, F y Pérez-Jiménez F. Postprandial lipemia is modified by the presence of the polymorphism present in the exon 1 variant at the SR-BI gene locus. *J. Mol Endocrinol.*, 32: 227-245, 2004.

Quick, T. C; Ong, D.E. Vitamin A metabolism in the human intestinal Caco-2 cell line. *Biochemistry* 29: 11116-11123, 1990.

Real Decreto 1275/2003. Boletín Oficial del Estado, octubre 2003.

Reglamento (CE) N° 1924/2006 del parlamento europeo y del consejo sobre la declaraciones nutricionales de propiedades saludables de los alimentos. L12/3-18 (18-01-2007)

Reglamento (CE) N° 1925/2006 del parlamento europeo y del consejo sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos. L404/26-38 (30-12-2006)

Renuka, K.D; Silva, R; Williams, M.C; Lovegrove, J.A. Use of water miscible retinyl palmitate as markers of chylomicrones guves earlier peak response of plasma retinyl esters compered with oil-soluble retinyl palmitate. Brit. J. Nutr. 86: 427-432, 2001.

Roodenburg, AJC; Leenen, R; Van Het Hof, KH; Weststrate, JA; Tijburg, LBM. Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of α -carotene, β -carotene, and vitamin E in humans. Am. J. Clin. Nutr. 71 (5) 1187-1193, 2000.

Russell, R.M.; Baik, H; Kehayias, J.J. Older men and women efficiently absorb vitamin B-12 from milk and fortified bread. J. Nutr. 131: 291-293, 2001.

Ruotolo, G; Zhang, H; Bentsianov Vitaly; Le, N Protocol for the study of the metabolism of retinyl esterases in plasma lipoproteins during postprandial lipemia. J. Lipid Res 33: 1541-1549, 1992.

Sandstrom, B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. Brit. J. Nutr., 85: S181-185, 2001.

Sauvant, P; Mekki, N; Charbonier, M; Portugal, H; Lairon, D; Borel, P. Amounts and types of fatty acids in meals affect the pattern of retinoids secreted in human chylomicrones after a high-dose preformed vitamin A intake. Metabolism, 52 (4): 514-519, 2003.

Schümann, K; Classen, H.G. Hages, M; Prinz-Langenohl, R; Pietrzik, K Biesalski, H.K. Bioavailability of oral vitamins, minerals, and trace elements in perspective. *Arzneim.-Forsch*, 47 (4) 369-380, 1997.

Segura, R. Composición y estructura de las lipoproteínas. En *lipoproteínas plasmáticas y aterosclerosis coronaria*. Editorial MCR, 29-70, 1988.

Shah, N.P. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Brit. J. Nutr.* 84 suppl. 1: S3-10, 2000.

Stahl, W; Van den Berg, H; Arthur, J; Bast, A; Dainty, J; Faulks, RM; Gärtner, C; Haenen, G; Hollman, P; Holst, B; Kelly, FJ; Polidori, MC; Rice-Evans, C; Southon, S; Van Vliet, T; Viña-Ribes, J; Williamson, G y Astley SB. Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med* 23 (1): 39-100, 2002.

Sokol, R.J. Vitamin E. in *Present knowledge in Nutrition*. Ziegler, E.E & Filer L.J. (Eds) ILSI press 130-136, 1996.

Traber, MG.; Cohn, W.; Muller, DR. Absorption, transport and delivery to tissues. In *Vitamin E in Health and disease*. (Packer, L. and Fuchs, J. eds) Marcek Dekker. New York, 35-53, 1992.

Traber, M.G. Vitamin E, oxidative stress and “healthy ageing” Eur. J. Clin. Invest., 27: 822-824, 1997.

Traber, M.G. How much vitamin E?Just enough! Am. J. Clin. Nutr., 81, 5: 959-960, 2006.

Thurnham D. I. Davies, J.A.; Crump, B.J.; Situnayake, A.D. and Davis, M.
The use of different lipids to express serum tocopherol: lipid ratios for the measurement of vitamin status. Ann. Clin. Biochem., 23 514-520, 1986.

Thurnham, DI y Northrop-Clewes CA. Optimal nutrition: vitamin A and the carotenoids. Proc Nutr Soc, 58, 449-457, 1999.

Underwood, B.A. Vitamin A in animal and human nutrition. En The retinoids. Sporn, M.B; Roberts, A.B; Goodman, D.S. (Eds) (1) 281-332, 1984.

USAID, 1999. Food Fortification Basics: Milk.
<http://www.sightandlife.org/ffbasics/MILK.PDF> (consultada en diciembre 2002)

U.S. Department of Agriculture. 2002 USDA National Nutrient Database of Standard Reference, Release 15. Nutrient Data laboratory Home Page
<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcoop> (consultada en mayo 2006)

Van den Berg, H. General aspects of bioavailability of vitamins. En Bioavailability'93: Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient bioavailability . Schlemmer, U. (Ed). (2^a Parte), 267-278, 1993.

Van den Berg, H; Van der Gaag, M; Hendriks, H. Influence of lifestyle on vitamin bioavailability. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 72 (1), 53-59, 2002.

Van het hof, K.H. Tijburg, L.B.M; Pietrzik, K., Weststrate, J.A. Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix. Brit. J. Nutr., 82:203-212, 1999.

Van het hof, K; West, C.E; Weststrate, J.A; Hautvast, JGAJ. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. J. Nutr., 130: 503-506, 2000 a.

Van het Hof, K.; de Boer, B.; Tijburg, L; Lucius, B. Zijp, I; West, C.; Hautvast, J.; Weststrate, J. Carotenoids bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoids response in the triglyceride-rich lipoprotein Fraction of Plasma after a Single consumption and in plasma after four days of consumption. J. Nutr. 130: 1189-1196, 2000 b.

Van Vliet, T; Schreurs, WHP, Van den Berg, H. Intestinal β -carotene absorption and cleavage in men: response of β -carotene and retinyl esters in the triglyceride-rich lipoprotein fraction after a single oral dose of β -carotene. Am. J. Clin. Nutr., 62: 110-6, 1995.

Vidal-Valverde, C; Ruiz, R; Mendrano A. Stability of retinol in milk during frozen and other storage conditions. *Z Lebensm Unters Forsch*; 195(6): 562-565, 1992.

Vidal-Valverde, C; Ruiz, R; Mendrano A. Effects of frozen and other storage conditions on alpha tocopherol content of cow milk. *J. Dairy Sci.*, 76 (6): 1520-1525, 1993.

West, C.E; Castenmiller, J.J. Quantification of the “SLAMENGHI” factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. *Int. J Vitam Nutr Res.* 68 (6): 371-377, 1998.

WHO/UNICEF/USAID/ Keller, H. Control of vitamin A deficiency and xerophthalmia. International / IUACG Meeting. Tech. rep. ser. n° 672, 1982.

World Health Organization. Use of anticoagulants in diagnostica laboratory investigations . WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2 44-45, 2002.

Williams A.W; Erdman, JW. Food processing: nutrition, safety and quality balances in *Modern Nutrition in Health and Disease*, 9th ed. William & Wilkir, Balt. 1813-182, 1999.

Wilson, PDG; Dainty, J.R. Modelling in nutrition: an introduction. *Proc Nutr Soc* :58:133-138, 1999.

Wollard, D.C. and Fairweather, J.P. The storage stability of vitamin A in fortified ultra-high tempetature processed milk. *J. micr. Anal.*, 1, 13-21, 1985.

[http:// www.maypa.es/notas/documento/panel_consumo_2003.pdf](http://www.maypa.es/notas/documento/panel_consumo_2003.pdf) (consultada en abril 2004)

<http://www.eurofir.net> (consultada en marzo de 2007)

ANEXOS

ANEXO I: INFORMACIÓN A PARTICIPANTES

Proyecto de Investigación:

BIODISPONIBILIDAD DE VITAMINA A (RETINOL, ESTERES DE RETINOL) Y VITAMINA E (α -TOCOFEROL) Y CAROTENOIDES EN PRODUCTOS LACTEOS EN SUJETOS CONTROL.

Estudio financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 98/0386) y autorizado por el Comité Etico de Investigación Clínica (Clínica Puerta de Hierro).

Unidad de Vitaminas.

Clínica Puerta de Hierro (C.P.H.).

Voluntarios participantes 6 hombres y 6 mujeres, entre 20-30 años.

Criterios de exclusión: colesterol y/o triglicéridos en sangre elevados, diabetes, obesidad, tratamiento con cualquier tipo de medicamento (incluidos: anticonceptivos, vitaminas, minerales, productos de herbolario)

En qué consiste el estudio:

1.- Si se cumplen los requisitos anteriormente mencionados, ponerse en contacto con la Unidad de Vitaminas de la C.P.H. Tel: 91-3162341 ext 5447 o 5448 (Dres: B. Olmedilla, F. Granado).

2.- Ir a la Unidad de Vitaminas cualquier día de la semana del 15 al 19 de enero entre las 8 y 9 de la mañana: *en ayunas (para extracción de sangre), * recibirá información.

3.- Si participa tendrá que tomar una dieta baja en retinol durante 1 día. (se aportará la información necesaria).

4.- Al día siguiente de esa dieta, ir a la CPH a las 8 menos cuarto, extracción de sangre, y tomar de desayuno: 430 ml leche y 10 galletas (ambos productos comercializados en el mercado). Durante las siguientes siete horas se extraerá sangre (ca. 8 ml) cada hora.

La participación de cada voluntario, consiste en realizar los puntos anteriores 3 y 4, tres veces, tres semanas consecutivas (las correspondientes al 23 o 24 de enero; 30 o 31 de enero y 6 o 7 de febrero 2001).

En el punto 4, estancia en la Clínica de 8 menos cuarto a 3 y media), en cada semana se tomará lo siguiente: 1ª semana, leche entera; 2ª semana, leche entera enriquecida en vitaminas; 3ª semana, leche desnatada enriquecida en vitaminas.

Se solicita a los voluntarios que si participan lo hagan en el estudio completo, es decir las tres semanas. Se ha previsto una compensación económica y el desayuno y comida están pagados por el laboratorio en la CPH.

Gracias por su interés y participación.

ANEXO II: CUESTIONARIO DE ENTRADA

**BIODISPONIBILIDAD DE VITAMINA A (RETINOL, ESTERES DE RETINOL),
VITAMINA E (α -TOCOFEROL) Y CAROTENOIDES EN PRODUCTOS LACTEOS
EN SUJETOS CONTROL.
PROYECTO FIS 98/0386**

NOMBRE:

APELLIDOS:

FECHA DE NACIMIENTO:

DOMICILIO:

TELEFONO:

SEXO:

EDAD:

PESO:

TALLA:

BMI:

TABACO:

Desde (tiempo)

No de cigarrillos/día:

TOMA MEDICAMENTOS (Vitaminas, minerales, anticonceptivos, corticoides):

PRODUCTOS DE HERBOLARIO:

TOMA LECHE O DERIVADOS LACTEOS TODOS LOS DÍAS? O A LA SEMANA

Cuántas veces/día ?

o a la semana ?

Qué lácteos toma mas frecuentemente ?

Qué lácteos evita tomar ?

COME TODOS LOS DIAS FRUTA ? O A LA SEMANA ?

Cuántas piezas/día? o a la semana ?

Qué frutas toma mas frecuentemente?

Qué frutas evita tomar ?

COME TODOS LOS DIAS VERDURA ?O A LA SEMANA ?

Cuántas veces/día ? o a la semana ?

Qué verduras toma más frecuentemente?

Qué verduras evita tomar ?

COME REGULARMENTE CARNE, PESCADO, HUEVO?

EVITA ALGUNO DE ELLOS

FECHA:

MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

ANEXO III: CONSENTIMIENTO INFORMADO

**BIODISPONIBILIDAD DE VITAMINA A (RETINOL, ÉSTERES DE RETINOL)
VITAMINA E (α -TOCOFEROL) Y CAROTENOIDES EN PRODUCTOS LACTEOS
EN SUJETOS CONTROL.
PROYECTO FIS 98/0386**

Yo,

He leído la información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

Entiendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos futuros.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

Fecha:

Firma del participante

D.N.I.

ANEXO IV: RECOMENDACIONES DIETETICAS PARA EL ESTUDIO

**BIODISPONIBILIDAD DE VITAMINA A (RETINOL, ÉSTERES DE RETINOL),
VITAMINA E (α -TOCOFEROL) Y CAROTENOIDES EN PRODUCTOS LÁCTEOS
EN SUJETOS CONTROL.**
PROYECTO FIS 98/0386

DIETA POBRE EN RETINOL (Durante el día anterior a la extracción)

Se evitarán los siguientes alimentos: vísceras (hígado, riñones, ...etc), leche (entera o semidesnatada), yogures, quesos, mantequilla, margarina y otros derivados lácteos, así como preparados alimenticios que en su elaboración lleve algunos de estos alimentos (croquetas,)

DIETA POBRE EN CAROTENOIDES (Durante el día anterior a la extracción)

Se evitara los siguientes alimentos (en general todos los que tienen colores):

Hortalizas: espinacas, acelgas, judías verdes, alcachofas, coles de Bruselas, berza, lechuga, espárragos trigueros, pimientos (verdes, rojos o amarillos), guisantes, brócoli, escarola, apio (blanco o verde), habas verdes, zanahoria, tomate (natural, frito, zumo, salsas en sopa, ...), grelos, cardo, calabaza, maíz, puerros, endibia, nabos, berenjenas, perejil, berros.

Frutas: naranja, mandarina, plátano, melocotón, nectarina, albaricoque, sandia, melón galo (interior anaranjado), piña, frambuesas, arándano, ciruelas (de cualquier color) kaki, nísperos, granada, pomelo, aguacate, mango, frutas secas, en mermelada o confituras.

Otros: Helados o sorbetes (de colores) yema de huevo, quesos, yogures o derivados lácteos con frutas, natillas, flanes, mantequilla, vísceras, gazpacho, chorizo, sobrasada, patés, mariscos, salsa para cóctel, ketchup, pizzas, empanadillas, zumos comerciales de frutas, refrescos (fanta, trinaranjus), trucha, salmón.

Cremas, tartas: Cremas que se elaboren con leche o con queso, crema de calabacín, crema de espárragos o champiñón, tartas de queso,...

Suplementos vitamínicos: vitaminas, minerales y productos de herbolario.

Alimentos que sí puede comer:

Hortalizas: coliflor, repollo, lombarda, cebolla, pepino (sin piel), calabacín (sin piel), patatas, níscalos, setas, champiñón, espárragos blancos, rábanos,...

Frutas: Peras (sin piel), manzanas (sin piel), limón, fresón, cerezas, melón, kiwis, chirimoya, uva blanca.

Otros: arroz, pasta, pan blanco o integral, clara de huevo, ajo, garbanzos, judías blancas o pintas, lentejas, carnes (todas menos las adobadas), aves, caza, pescados (blancos o azules, sepia, calamares, atún o bonito, bacalao, ostras, chirlas, pulpo (no añadir pimentón) embutidos (sin pimentón), frutos secos, vinos, cerveza, refrescos (gaseosas tónicas).

ANEXO V: REGISTRO DE DIETA DEL DIA ANTERIOR AL ESTUDIO

**BIODISPONIBILIDAD DE VITAMINA A (RETINOL, ESTERES DE RETINOL),
VITAMINA E (α -TOCOFEROL) Y CAROTENOIDES EN PRODUCTOS LÁCTEOS
EN SUJETOS CONTROL
PROYECTO FIS 98/0386**

NOMBRE:

FECHA:

Por favor, escriba los alimentos que tomo el día anterior al estudio, indicando cantidad aproximada, número de piezas, tamaño,.....

DESAYUNO:

MEDIA MANANA:

COMIDA

CENA:

ANTES DE ACOSTARSE:

!! GRACIAS POR SU COLABORACION!!

TRABAJOS DERIVADO DE LA TESIS

10.- TRABAJOS DERIVADO DE LA TESIS.

PUBLICACIONES (documentos adjuntos).

"Vitamin A and E content in dairy products: their contribution to the recommended dietary allowances for elderly people". Herrero, C; Granado, F; Blanco, I; Olmedilla, B. **J. Nutr. Health & Ageing** 6 (1): 57-59; **2002**.

"Retinol, α - and γ -tocopherol and carotenoids in natural and vitamin-fortified dairy products commercialized in Spain". Herrero-Barbudo, MC; Granado-Lorencio, F; Blanco-Navarro, I; Olmedilla-Alonso, B. **Int. Dairy J.** 15 (5) 521-526; **2005**.

"Bioavailability of vitamins A and E from whole and vitamin-fortified milks in control subjects" Herrero-Barbudo, C; Olmedilla-Alonso, B; Granado-Lorencio, F; Blanco-Navarro, I. **Eur. J. Nutr.** 45 (7): 391-398, **2006**.

ARTÍCULOS DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

"Contenido de vitaminas A, E y carotenoides en leche líquida entera y fortificada con vitaminas". Herrero, C; Granado, F; Blanco, I; Olmedilla, B. **CTC Alimentación**, (20) 44-47; **2004**.

"¿Es eficaz la fortificación de leche con vitamina A? Herrero, C. **Revista de nutrición práctica (IX Jornadas de Nutrición práctica)**, (9) 54-57; **2005**.

"Alimentos con base láctea enriquecidos con vitaminas A y E" Herrero Barbudo, C
Revista del Colegio Oficial de Biólogos de la Comunidad de Madrid. Biólogos. (9) 9-13;
2006.

“Biodisponibilidad de vitaminas liposolubles (A y E) a partir de la leche”.

Herrero-Barbudo, MC; Granado-Lorencio, F; Olmedilla-Alonso, B. **Formación Continuada
Metabolismo y Nutrición**, (5); **2007.**

PUBLICACIONES EN VOLÚMENES COLECTIVOS

“Biodisponibilidad de retinol a partir de leche entera y enriquecidas en vitamina A en
sujetos control”. Herrero, C; Granado, F; Olmedilla, B; Blanco, I. (Resumen). **Nutr. Hosp.**
16(5): 204; **2001.**

“Utilización de materiales de referencia para el análisis de vitaminas A y E en productos
lácteos”.. Herrero, C; Granado, F; Olmedilla, B; Blanco, I. (Resumen). **Nutr. Hosp.** 16(5): 203;
2001.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

“Contenido de Vitaminas A, E y Carotenoides en productos lácteos comercializados
en la Comunidad de Madrid” Herrero, C; Granado, F; Blanco, I; Olmedilla, B. (Comunicación

oral) **VII Reunión Científica de la Sociedad Española de Nutrición.** Barcelona, 28 y 29 de septiembre de **2000**.

“Vitamins A and E content in Dairy products and their contribution to the Recommended Dietary Intakes for elderly” Herrero, C; Granado, F; Blanco, I; Olmedilla, B. (Poster) en el **Third European Congress on Nutrition and Health in the Elderly People.** Madrid, 23-25 de noviembre de 2000

“Bioavailability of retinol from whole and skimmed vitamin-A fortified milk in control subjects”.. Herrero, C; Olmedilla, B; Granado, F; Blanco, I. (Poster) **Bioavailability 2001.** Interlaken (Switzerland), 30 de mayo – 1 de junio, 2001.

"Utilización de Materiales de Referencia en el análisis del contenido de vitaminas A y E en productos lácteos" Herrero, C; Granado, F; Olmedilla,B; Blanco, I. (Póster) **VIII Reunión Científica de la Sociedad Española de Nutrición.** La Manga del Mar Menor (Murcia), 24-27 octubre de **2001**.

"Biodisponibilidad de retinol a partir de leche entera y leches enriquecidas en vitamina A en sujetos control".. Herrero, C; Granado, F; Olmedilla, B Blanco, I. (Comunicación oral) **VIII Reunión Científica de la Sociedad Española de Nutrición.** La Manga del Mar Menor (Murcia), 24-27 octubre de **2001**.

“Biodisponibilidad de retinol a partir de leche entera y leches enriquecidas en vitamina A en sujetos control.” Herrero, C.; Granado, F; Olmedilla, B; Blanco, I. (Poster) **V Congreso Internacional de Alimentación Nutrición y Dietética**, Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, 14, 15 y 16 de noviembre de **2001**.

“Contenido de vitaminas A, E y carotenoides en leche líquida entera y fortificada con vitaminas” Herrero, C.; Granado, F; Olmedilla, B; Blanco, I. (Oral) **X Congreso Anual en Ciencia y Tecnología de los Alimentos** Facultad de veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, 24-27 marzo, **2004**.

"¿Es eficaz la fortificación de leche con vitamina A? Herrero, C. (Comunicación oral) **IX Jornadas sobre Nutrición Práctica**, organizadas por **Dietecom España, S.L.** Colegio Oficial de Médicos, Madrid, 26-27 abril **2005**.

"Biodisponibilidad de vitaminas A y E a partir de leche entera y enriquecida en sujetos control". Herrero, C. (Comunicación oral) **Nutrición, Metabolismo y Salud: nuevos retos**. Red de Centros de Metabolismo y Nutrición (C03/08), Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad) Reus, 17-18 noviembre **2005**.

"Biodisponibilidad de vitaminas A y E a partir de leche entera y enriquecida en sujetos control". Herrero, C. (Comunicación oral) **Seminarios de Investigación**, Fundación Para la Investigación Biomédica en el Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid, 26 de enero de **2006**.

PUBLICACIONES (documentos adjuntos).

VITAMIN A AND E CONTENT IN DAIRY PRODUCTS: THEIR CONTRIBUTION TO THE RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCES (RDA) FOR ELDERLY PEOPLE

C. HERRERO, F. GRANADO, I. BLANCO, B. OLMEDILLA*

Unidad de Vitaminas, Clínica Puerta de Hierro. C/ San Martín de Porres, 4. Madrid 28035 (Spain). *Correspondence: e-mail: bolmedilla@hph.INSALUD.es

Abstract: **OBJECTIVE:** To determine the vitamin A, E and individual carotenoid content in dairy products and to assess their potential contribution to Recommended Dietary Intakes in elderly persons. **METHODS:** Dairy products frequently consumed were analyzed: whole, semi-skimmed and skimmed milk, vitamin-fortified milk, dry powder milk, yoghurt, cream, smelted and grated cheese, custard, butter, margarine and dairy-based probiotic products. Analysis were performed by HPLC as previously described. Accuracy and precision were assessed using Reference / Certified Materials. **RESULTS:** Vitamin A occurs as ester forms (mostly retinyl palmitate) whereas vitamin E is present as free form (mainly α -tocopherol). In supplemented / fortified products they are added as ester forms, namely retinyl and tocopheryl acetate, respectively. β -carotene was the only carotenoid quantifiable in most products. Based on recommended intakes for dairy products in Spain, the consumption of three standard portions / day provide about 16% and 3% of the RDI for vitamin A (1000 μ g/d) and E (15 mg/d), respectively. The same consumption but using fortified/ supplemented milk and yoghurt, may increase the contribution up to 39% (vitamin A) and 24% (vitamin E) of the RDI for elderly subjects. **CONCLUSION:** The inclusion of fortified dairy products in the diet may be a practical, sustainable and cost-effective approach for improving vitamin intake and status in the elderly.

Key words: Vitamin A and E, dietary allowances, RDA, elderly, nutrition, aging, nutritional status assessment.

Introduction

Nutritional status assessment is essential to detect deficient and/or marginal situations, specially in groups at risk, and to evaluate the need for nutritional intervention. When dietary methods are used for this purpose, then it is necessary to assume the reliability of food composition data. Food Composition Tables and Databases frequently used display total content of vitamin A (retinol equivalents) and E (expressed as α -tocopherol and/or tocopherol equivalents) with no mention, in most instances, to the forms present, isomers, and/or molecular linking of the vitamins, factors that may affect significantly their relative bioavailability.

Dairy products are major sources of several micronutrients (i.e. vitamin A, calcium) in Western diets and, because of the wide variety of products and high consumption in the population, they constitute an excellent matrix that Food Industry is using to develop new and functional products whose consumption may have a significant impact in Public Health, specially, in those groups at risk for marginal nutritional status. Elderly people may be considered, because of different reasons, a group specially at risk for low/marginal status of several micronutrients and it is widely accepted that nutritional care may improve longevity and life quality (1-4). In this context, vitamin-fortified dairy products may constitute an important, safe, sustainable and cost-effective approach to improve nutritional status in this group. However, in spite of its potentially health benefits, little information is available on the

individual content of vitamins (and chemical forms) in traditional dairy products and, specially, in those recently developed and introduced in the market and, most importantly, the effect on their bioavailability in humans.

With the aim of assessing the bioavailability and the potential nutritional impact derived from the consumption of dairy products in elderly people, we determined in the first phase, the individual content of vitamin A (retinol and retinyl esters), vitamin E (tocopherol and tocopheryl esters) and carotenoids in traditional and new developed dairy products. In addition, we are also assessing the relative bioavailability of these vitamins from vitamin-fortified dairy products in humans.

Material and methods

A total of twenty six different dairy products distributed by the major Dairy Industries in the Spanish market were analyzed. Products were selected according to Nationwide Statistics of Consumption (5) and included: milk (whole, semiskimmed, skimmed); vitamin A, E, folic acid- fortified milk and yoghurts; fermented milk (probiotics, prebiotics); low, medium and high-fat cheese and dairy based products (custard, curd, cream and caramel cream).

Methods

Sampling method consisted of purchasing milk and dairy products at, at least, three different supermarkets distributed across the city. Quadruplicate samples from two packs (within

VITAMIN A AND E CONTENT IN DAIRY PRODUCTS

the same season) from each product were analyzed. Seasonal variations (different lots) were also studied in some products. To determine individually the presence of free, esters forms and added forms, analysis were performed before and after submitting the sample to saponification. Samples were extracted and hydrolyzed as described previously (6,7) with slight modifications.

Analysis of vitamin A, E and carotenoids in dairy products was carried out by a quality-controlled HPLC system (8). Compounds were identified by using a photodiode array detector (Waters) comparing retention times and on-line UV-VIS spectra with those of authentic standards. The content of vitamin A, E and carotenoids in dairy products samples was determined against external calibration curves using internal standard (b-cryptoxanthin).

Methodological quality-control included our participation in the QA-Fat soluble Assurance Programme (NIST, USA) and the use of commercially available Reference Materials for the determination of fat-soluble vitamins in milk ["Standard Reference Material 1846 Infant Formula" from NIST and BCR N° 380 (Bureau Community of Reference)].

Contribution to the Recommended Dietary Allowances

The percentual contribution of different dairy products to the RDA for elderly people (65 y and older) were assessed using the values determined for vitamin A, E and carotenoids and standard portions (9) for each dairy product. For comparative purposes, the RDA values used were 700 or 900 mg Retinol Equivalents for vitamin A (for women and men respectively) (10) and 15 mg α -tocopherol for vitamin E (for men and women) (11). For carotenoids, there is no accepted recommended daily intakes.

Results and discussion

The vitamin A and E content (range) in dairy products is shown in table 1. In milk and traditional dairy products, vitamin A is present in ester forms, being the most abundant retinyl palmitate. Free retinol is almost absent or below the detection limit of our method (<0.5 μ g/100ml). The vitamin A content in traditional products increases according to the fat content of the items. In vitamin-fortified dairy products, vitamin A is found as retinyl acetate, a form normally not present in unsupplemented dairy products. In commercially available new developed dairy products (probiotics: BIO), the content of vitamin A also depends on the fat content, being very low or absent in skimmed milk-based products.

β -carotene is the carotenoid normally present in milk and its content is related to the fat content. Both "trans" and "cis" isomers (mostly 13-/15-cis) of β -carotene are present with an average ratio of 3:1 respectively, whereas lutein and zeaxanthin are present in significant amounts only in egg-containing dairy products.

Table 1

Vitamin A and E content (range) in dairy products and contribution to RDA in elderly people (> 65 y) (*)

DAIRY PRODUCT	VITAMIN A		VITAMIN E	
	μ g Retinol-Equiv. /100 ml	% RDA (range) (men/women)	μ g α -Tocoph. / 100ml	% RDA (range) (men/women)
MILK				
Whole	16 - 51	8 - 10	23 - 195	1
Semiskimmed	12 - 16	3 - 5	42 - 57	< 1
Skimmed milk	<0.5 - 6	< 1	<0.5 - 72	< 1
Whole, Vitamin-fortified	137 - 257	42 - 54	533 - 3158	26
Semiskimmed, Vitamin-fortified	116 - 177	37 - 47	1995 - 2216	28
Skimmed, Vitamin-fortified	76 - 170	30 - 38	1380 - 1842	21
YOGHOURT				
Full fat (Solid)	31 - 37	6 - 7	62 - 71	< 1
Reduced fat (Liquid)	11 - 16	2 - 3	<0.5 - 105	< 1
Skimmed (Solid)	<0.5	<0.5	125 - 253	< 1
DAIRY PRODUCTS				
Curd, caramel cream, custard	19 - 69	6 - 9	48 - 745	< 1 - 4
CHEESE				
Fat content (3.8 - 50%)	43 - 333	2 - 14	69 - 830	< 1 - 2

(*) Percentages estimated using mean concentrations and assuming intakes of standard portions and/or commercial packages: Milk (200 ml), Yoghourt (125-140 g); Dairy products (110-140 g); cheese (35-60 g).

Vitamin E content varies widely among dairy products but it follows a similar pattern like vitamin A, i.e. the more fat, the higher vitamin E content. Vitamin E is present as free form, mainly α -tocopherol, whereas other vitamins such as γ - and δ -tocopherol are only present in some products i.e. caramel cream. In vitamin E-fortified dairy products, vitamin E is present as tocopheryl acetate.

A significant variability in vitamin A and E content was observed between brands and lots of traditional dairy products (milk, yoghurt, cheeses, butter) which may be probably related to seasonal and geographical differences of the products. However, despite this significant variability, the vitamin A and E content is, in general, within the range of values reported by Food Composition Tables frequently used (12-14). Vitamin-fortified milks usually contain their original content plus the amount added and the total content of vitamin A and E quantified in these products was higher than that reported in the nutritional label.

The consumption of a standard portion of non-fortified dairy products may contribute between 0-14% to the RDA for vitamin A and <1 -4 % for vitamin E in elderly people. However, as shown in table 1, the consumption of the same (standard) portions of vitamin-fortified dairy products may provide up to 54% and 25-30% for vitamin A and E, respectively. Thus, the consumption of vitamin-fortified dairy products improve significantly the contribution to the RDA in the elderly. Because elderly people usually consumed diets with less energy, the inclusion of vitamin-fortified dairy products may be a safe, sustainable, and cost-effective approach to ensure vitamin intake and improve vitamin nutritional status in the

THE JOURNAL OF NUTRITION, HEALTH & AGING®

elderly within a balanced diet, although the bioavailability of the added forms in humans, under conditions of daily consumption, is being evaluated.

Acknowledgements: This work was funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, 98/0386).

References

1. Keane, E.M., O'Brien S, et al. Use of folic Acid-fortified milk in the elderly population. *Gerontology*, 44(1998): 336-339.
2. Meydani, S. N; Ha, W-K. Immunologic effects of yogurt. *Am J.Clin.Nutr*; 71 (2000): 861-872.
3. Weinsier, R.L.; Krumdieck, C.L. Dairy food and bone health:examination of the evidence. *Am J.Clin.Nutrition* 72(2000): 681-9.
4. Barr, S.J.; McCarron, D. A. et al. Effects of increased consumption of fluid milk on energy and nutrient intake, body weight, and cardiovascular risk factors in healthy older adults. *Journal of the American Dietetic Association*, 100,7(2000): 810-817.
5. Encuesta de Presupuestos Familiares 1990-91 Tomo 1. Instituto Nacional de Estadística. Madrid. España. (1995).
6. Olmedilla B; Granado F; Gil-Martínez E; Blanco I; Rojas-Hidalgo E. Reference values for retinol, tocopherol, and main carotenoids in serum o control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. *Clin. Chem.* 43:6 (1997): 1066-1077.
7. Granado, F; Olmedilla, B; Gil-Martínez, E; Blanco, I. A fast, reliable and low-cost saponification protocol for analysis of carotenoids in vegetables. *J. Food Comp. Anal*, 14(2001):478-89.
8. Olmedilla, B; Granado, F; Rojas-Hidalgo, E; Blanco, I. A rapid separation of ten carotenoids, three retinoids, alpha-tocopherol and tocopherol acetate by high performance liquid chromatography and its application to serum and vegetable samples. *J. Liquid. Chromatography* 13(8) (1990): 1455-1483.
9. El rombo de la Alimentación. Departamento de Nutrición. Universidad Complutense. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid. 1996.
10. National Academy of Science (Institute of Medicine). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. National Academy Press, Washington D.C (USA). 2001.
11. National Academy of Science (Institute of Medicine). Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. National Academy Press, Washington D.C. (USA). 2000.
12. O. Moreiras, A. Carbajal, L. Cabrera. Tablas de Composición de Alimentos Ediciones Piramides, S.A.,13. (1996).
13. S.W. Souci, W. Fachmann, H. Kraut. Food Composition and Nutrition Tables 1989/90. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1989.
14. S. Salvini, M. Parpinel, P. Gnagnarella, P. Maisonneuve, A. Turrini. Banca Dati di Composizione degli Alimenti per Studi Epidemiologici in Italia. Istituto Europeo de Oncologia. Abril, 1998.

Retinol, α - and γ -tocopherol and carotenoids in natural and vitamin A- and E-fortified dairy products commercialized in Spain

M.C. Herrero-Barbudo, F. Granado-Lorencio, I. Blanco-Navarro, B. Olmedilla-Alonso*

Unidad de Vitaminas, Sección de Nutrición, Hospital Universitario Puerta de Hierro, C/ San Martín de Porres, 4. 28035 Madrid, Spain

Received 18 February 2004; accepted 18 July 2004

Abstract

Natural and added forms of vitamin A (all-*trans*-retinol, retinyl esters and β -carotene) and vitamin E (α -tocopherol, γ -tocopherol, tocopheryl acetate) were determined in commercially available dairy products that are frequently consumed. Retinyl esters, β -carotene and α -tocopherol are customarily found in natural dairy products, whereas retinyl and α -tocopheryl acetate occur in most vitamin-fortified products. Lutein, zeaxanthin and γ -tocopherol were found in egg- and oil-containing products, respectively. α -Tocopheryl acetate was found in all vitamin-fortified dairy products analysed, whereas retinyl acetate was only present in fluid milks but not in margarines. Minor amounts of retinyl acetate may occasionally be found in some non-fortified milks, suggesting contamination during processing. In commercially available dairy products in Spain, retinyl palmitate and α -tocopherol contents vary substantially, especially in high fat and vitamin-fortified dairy products. Compared with the label claims in vitamin-fortified products, over-fortification predominates, although over- and under-fortification of both vitamins A and E may occur simultaneously in fluid milks. The wide variation observed in commercially available natural and vitamin-fortified dairy products may be an important source of bias and imprecision in nutritional studies.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Vitamin A; Vitamin E; Carotenoids; Dairy products; Fortification; HPLC

1. Introduction

Reliable information on food composition is essential both for the evaluation of diet and for nutritional research aiming to relate diet to health and disease, as well as for monitoring compliance and efficacy of nutritional interventions. Up-to-date food composition tables are needed to accurately estimate the intake of vitamins (i.e. vitamin A and E). Previous data are often based on unspecified analytical methods, which may have overestimated vitamin A intake. In addition, the origin of the data in national food composition tables may be uncertain or even unknown (Ollilainen, Heino-nen, Linkola, Varo, & Koiviston, 1989; Granado, Olmedilla, Blanco, Gil-Martínez, & Rojas-Hidalgo,

1997), or may simply be based on the information provided in the label claims. Moreover, the increasing number of non-traditional foods being made available (i.e. fortified foods) and the need for testing, monitoring and certification of the levels in fortified foods (Murphy et al., 2001), along with the changes in dietary patterns and the globalization of economic, marketing and trade aspects of the food industry make it necessary to update the composition of widely and frequently consumed foods regularly.

Milk and milk products provide a significant portion of vitamin A, especially to infants and children (Institute of Medicine, 2001). Considerable amounts of whole or low-fat milk and other dairy products are widely and regularly consumed, fulfilling most of the requirements as a suitable food for fortification (Dary & Mora, 2002). Moreover, the increasing presence and consumption of vitamin-fortified foods may even change the relative importance of several foods as the major contributors of

*Corresponding author. Fax: +34-1-373-7667.

E-mail address: bolmedilla.hpth@salud.madrid.org
(B. Olmedilla-Alonso).

certain nutrients (i.e. vitamin E) in the general population and, especially, in groups at-risk for not meeting reference intakes, such as children, adolescents, the elderly and people with certain diseases (Berner, Clydesdale, & Douglass, 2001; Serra-Majem, Ortega, Aranceta, Entrala, & Gil, 2001; Barr & McCarron, 2000; Herrero, Granado, Blanco, & Olmedilla, 2002). In developed countries, food fortification has proven to be an effective and low-cost way to increase the micronutrient supply and reduce the consequences of micronutrient deficiencies (Berner et al., 2001; Serra-Majem et al., 2001; Dary et al., 2002). This fact, along with other socioeconomic factors, has encouraged industries to improve the perceived value of their products through fortification (Dary et al., 2002).

However, variations in fortified-vitamin concentrations in milks have been widely reported (Hicks, Hansen, & Rushing, 1996) and several studies have found that, in many vitamin fortified fluid milks, measured concentrations of vitamins did not reflect product label claims (Murphy et al., 2001). Conditions under which vitamin preparations are stored, the methods used to add vitamins, the point during processing at which vitamin preparations are added and the processing errors were identified as factors that contribute to inconsistent concentrations of vitamin fortification (Hicks et al., 1996; Murphy et al., 2001). In this respect, although milk fortification is considered to be beneficial to many persons, aiding them to achieve the RDI for several micronutrients, vitamins A and D can be toxic when consumed in high amounts. Thus, the regular consumption of over-fortified milk has raised the question of whether vitamin fortification is safe (Hicks et al., 1996), especially for certain groups (i.e. pregnant women, children), and considering the lowering of recent recommendations (Institute of Medicine, 2001) for some nutrients (i.e. vitamin A).

The present work was carried out to assess the total content and individual forms, natural and added, of vitamin A (all-*trans*-retinol, retinyl esters and β -carotene) and vitamin E (α -tocopherol, γ -tocopherol, tocopheryl acetate) in traditional and vitamin-fortified, commercially available, dairy products frequently consumed. Our aims were to provide reliable information to update food composition tables currently in use, to evaluate vitamin fortification compliance in fluid milk and to use this information (chemical forms and content) for bioavailability studies of dairy products in humans (to be published elsewhere).

2. Material and methods

2.1. Sample collection

Dairy products to be analysed were singled out according to Nationwide Consumption Data (INE,

1995), whereas the selection of dairies was based on market distribution shares supplied by the National Federation of Dairy Industries (1998). A total of 22 dairy products representing 17 different commercial brands were randomly sampled from different stores ($n = 8$) located in the community of Madrid (including urban and rural) during the winter season. Fluid milk samples from nine different processing plants (five of the eight top producers) representing ca. 50% of the total market share were analysed. Samples of yoghurts and other dairy products came from the three top processing plants covering almost 75% of the market. The cheeses studied were also manufactured by the top market producers but, due to the huge variety commercially available, they were selected according to their fat content (degree of maturation) and consumer preferences. The dairy products analysed in the study included fluid milks (whole, low-fat, skim), vitamin-fortified fluid milks (whole, skim), yoghurts (whole, low-fat, skim, cream-enriched), cream, cheese (with different fat contents), curd, custard, caramel cream, butter and vitamin-fortified margarines.

2.2. Standards and reagents

All-*trans*-retinol, retinyl acetate, retinyl palmitate, α -tocopherol, γ -tocopherol, tocopheryl acetate, β -carotene, α -carotene, lycopene, lutein and ammonium acetate were purchased from Sigma Chemical Co (Spain). Zeaxanthin and β -cryptoxanthin were kindly supplied by Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland). Butylated hydroxytoluene (BHT), potassium hydroxide (KOH), pyrogallol, tetrahydrofuran (THF), isopropanol and water (HPLC grade) were obtained from Carlo Erba (Spain). Ethanol, hexane, acetonitrile, methanol, methylene chloride (HPLC grade) and sodium chloride were from Merck (Spain). Quality control of the method was carried out using commercially available reference materials (Infant Formula, SRM 1846 from NIST, Gaithersburg, MD, USA; whole milk powder, CRM 421 from Laboratory of the Government Chemist, Teddington, UK).

2.3. Vitamin and carotenoid extraction

To mimic the actual market situation for consumers, we decided to assess unit-to-unit, lot-to-lot and dairy-to-dairy plant variation in commercially available dairy products. Thus, after purchasing, samples for which the labels made equivalent nutritional claims were not pooled but analysed individually for vitamin and carotenoid content. Analysis of each product was performed in two units/production lot, in 1–3 different lots, each one corresponding to 1–3 different dairies. For all products, two simultaneous extraction protocols were used (with and without alkaline hydrolysis), each

one performed in quadruplicate. This approach allowed us to determine, individually, the presence of natural and added forms (ester forms), as well as the total vitamin A and E content of the product. All procedures were performed under dimmed light.

Fluid samples were shaken before the collection of aliquots (200 mL), which were heated to 85 °C while mixing with magnetic stirring. Once this temperature was reached, 1 mL samples (in quadruplicate) were collected and, after addition of 0.1 mL of ethanolic β -cryptoxanthin (as internal standard) and 0.9 mL of ethanol, were vortexed for 1 min. Each sample was extracted using hexane stabilized with BHT (0.01%) and methylene chloride (5:1) and the mixture was placed in an ultrasonic bath for 5 min. The sample was centrifuged (5000 rpm, 5 min) and the extraction was repeated. Organic phases were pooled, evaporated under nitrogen atmosphere, reconstituted and filtered to be injected onto the HPLC system.

To estimate the total vitamin A and E content, samples were directly subjected to alkaline hydrolysis. To cooled samples (4–7 °C), 0.1 mL of β -cryptoxanthin (internal standard), 0.5 mL of pyrogalllic acid (0.3 M) and 0.5 mL of methanolic KOH (40%) were added. The mixture was vortexed and placed in an ultrasonic bath for 15 min with intermittent vortexing (final temperature in the ultrasonic bath was <45 °C). Samples were cooled and extracted twice with distilled water (containing 5% sodium chloride), isopropanol and hexane/methylene chloride (5:1). Organic phases were pooled, washed to remove KOH (until pH <7), evaporated, reconstituted and filtered to be injected. The processing of solid samples (i.e. cheese) included a preliminary step to homogenize the samples (i.e. grinding, and addition of some water) before being submitted to the same protocols.

Using the described protocols, recovery of added analytes (retinyl palmitate, α -tocopherol) in the absence of alkaline hydrolysis was >85%. Hydrolysis efficacy, estimated by the absence of ester forms, was >95% and recovery of added analytes (retinyl palmitate, α -tocopheryl acetate) after alkaline hydrolysis was >95% based on stoichiometric calculations. For fluid milks, within and between-day coefficients of variation (using the protocol with alkaline hydrolysis) were <5% and <10% for retinol and <10% and <15% for α -tocopherol, respectively.

2.4. Chromatographic analysis

An ALC/GPC chromatograph (Model 201, Waters Associates, Milford, USA) equipped with two pumps (model 6000 and M45) and a manual injector (Rheodyne) was used. Analytes were simultaneously detected with a photodiode array detector (PDA 996, Waters Assoc., Milford, USA) set at 326 nm for retinoids,

294 nm for tocopherols and 450 nm for carotenoids. Data acquisition was performed using Millennium Station (Waters Assoc., Milford, USA). Simultaneous separation of retinol (*trans* + *cis*), α - and γ -tocopherol and major carotenoids present in human serum (lutein/zeaxanthin, β -cryptoxanthin, lycopene, α - and β -carotene) was carried out as previously described (Granado, Olmedilla, Blanco, & Rojas-Hidalgo, 1991) using a polymeric column (Spheri-5 ODS, 5 μ m \times 4.6 \times 220 mm) with RP-18 guard column (7 μ m) and acetonitrile/methylene chloride/methanol (70:20:10, v/v/v) at an isocratic flow rate of 1.3 mL min⁻¹ with a total runtime of 13 min. This method, however, does not resolve lutein and zeaxanthin individually and, thus, in products where one of these carotenoids was present, a gradient elution was also used to confirm their presence (Olmedilla, Granado, Gil-Martínez, Blanco, & Rojas Hidalgo, 1997). Analytes were identified comparing their retention time and on-line UV-spectra with those of authentic standards. Quantification was performed using calibration curves covering concentrations close to those found in the products. Retinyl esters were quantified against retinyl palmitate standard. Using the protocols described, quantification limits were <0.03 μ mol L⁻¹ for retinol, retinyl acetate and retinyl palmitate, 0.02–0.04 μ mol L⁻¹ for lycopene, α and β -carotene, β -cryptoxanthin, lutein and zeaxanthin and <0.23 μ mol L⁻¹ for α - and γ -tocopherol.

2.5. Statistical methods

The mean, standard deviation and coefficient of variation were calculated from four replicate analyses for each product and according to each dairy plant, in different lots and units. Correlation between fat content (as specified in the nutritional label) and the vitamin A and E content was performed using the Pearson correlation coefficient. All calculations were done using the SPSS statistical package (SPSS Inc. IL, USA).

3. Results and discussion

Qualitatively, vitamin A is found in dairy products as a mix of ester forms, retinyl palmitate being the major ester in natural (non-fortified) products. In these foods, several other vitamin A esters (tentatively identified by chromatographic behaviour and on-line spectra), possibly corresponding to *cis*-isomers and/or other fatty acid esters, are also present (Stancher, & Zonta, 1982; Ollilainen et al., 1989). The content of free retinol is very low or virtually absent (below the detection limit), whereas retinyl acetate is present in fortified-vitamin A fluid milks but not in fortified margarines. Nevertheless, in some non-fortified fluid milks, small quantities of retinyl acetate were also present. Regarding carotenoids,

preliminary studies by our group showed the absence of β -cryptoxanthin in dairy (fluid) products and, thus, it was used as internal standard. β -Carotene (*trans* and *cis*) was present in non- and partially defatted dairy products, whereas the presence of lutein/zeaxanthin, lycopene and α -carotene was not detected. Only in caramel cream (an egg-containing product), the presence of both lutein and zeaxanthin was consistently observed. Regarding vitamin E, free α -tocopherol was present in natural dairy products, whereas in fortified products (fluid milks and margarines), the added form was α -tocopheryl acetate. γ -Tocopherol was present only in those dairy products containing other non-dairy constituents (i.e. caramel cream, margarines).

In contrast to other methods for vitamin analysis in dairy products that involve direct matrix hydrolysis (Panfili, Manzi, & Pizzoferrato, 1994; Jensen & Nielsen, 1996; Gamiz-Gracia, Velasco-Arjona, & Luque de Castro, 1999; Albalá-Hurtado, Novella-Rodríguez, Veciana-Nogués, & Mariné-Font, 1997; Blanco, Fernández, & Gutiérrez, 2000; Turner, King, & Mathiason, 2001), our approach allows the simultaneous evaluation of natural and added forms in each product. In this respect, the protocol permits the detection of ester forms not present in unfortified products (i.e. acetate), possibly as a result of contamination during milk processing (i.e. the failure to use separate vitamin delivery systems) as suggested by Murphy et al. (2001), as well as the monitoring of fortification compliance and stability

under different processing and storage conditions since both the type and the quantity of natural and added forms can be directly and individually controlled. In this context, considering the requirements that processing plants have their milks periodically tested (Murphy et al., 2001), this approach may be of interest as a quality control method since it can be performed at a comparatively low-cost, and the quadruplicate analysis in both protocols plus the chromatographic step can be easily performed by one person within a single working day.

Retinol, tocopherol and carotenoid contents in the dairy products analysed are shown in Table 1. It should be noted that these data represent values obtained in the analysis of different units and lots from several dairy processing plants, purchased at different randomly selected stores, but labeled as having similar nutritional characteristics. Thus, regardless of the methodological variability, these values reflect true differences (variability) in the vitamin content of dairy products labeled as nutritionally equivalent. Even so, our results fall within the ranges reported in Food Composition Tables (Moreiras, Carvajal, & Cabrera, 1996; Souci, Fachmann, & Kraut, 1989; McCance & Widdowson's, 1998; Mataix & Manas, 1998; Salvini, Parpinel, Gnagnarella, Maisonneuve, & Turrini, 1998) and HPLC studies (Ollilainen et al., 1989; Holden et al., 1999). However, it should be noted that comparisons with previous reports are difficult because of uncertainties associated

Table 1

Vitamin A (retinal, β -carotene) and E (α -tocopherol, γ -tocopherol) content in dairy products (mean and SD, $\mu\text{mol L}^{-1}$; $\mu\text{mol kg}^{-1}$)

Dairy products	Dairies/lots/units per lot	Retinol	β -Carotene	α -Tocopherol	γ -Tocopherol
Milk, whole 3.6% fat	9/1/2	1.12 \pm 0.28	0.11 \pm 0.04	2.08 \pm 0.83	nd ^a
Milk, low-fat 1.5% fat	2/1/2	0.47 \pm 0.04	0.04 \pm 0.02	1.12 \pm 0.10	nd
Milk, skim 0.3% fat	2/1/2	0.08 \pm 0.04	0.07 \pm 0.01	0.95 \pm 0.49	nd
Milk, vitamin A- and E-fortified 3.6% fat	2/2/2	6.64 \pm 1.33	0.19 \pm 0.05	47.12 \pm 11.40	nd
Milk, vitamin A- and E-fortified 1.6% fat	1/2/2	7.11 \pm 1.71	0.10 \pm 0.03	49.05 \pm 2.07	nd
Milk, vitamin A- and E-fortified 0.3% fat	2/2/2	4.52 \pm 1.21	0.06 \pm 0.04	40.91 \pm 9.06	nd
Yoghurt, whole 3.1% fat	1/1/2	1.09 \pm 0.07	0.14 \pm 0.01	1.56 \pm 0.07	nd
Yoghurt, low-fat 1.6% fat	2/1/2	0.40 \pm 0.05	0.08 \pm 0.02	0.92 \pm 0.24	nd
Yoghurt, skim 0.0% fat	1/1/2	0.07 \pm 0.02	0.05 \pm 0.00	0.45 \pm 0.19	nd
Yoghurt, cream-fortified 3.6–3.9% fat	1/2/2	0.91 \pm 0.16	0.12 \pm 0.04	3.79 \pm 3.01	nd
Yoghurt, cream-fortified 10% fat	1/1/2	1.93 \pm 0.20	0.38 \pm 0.05	3.34 \pm 0.49	nd
Curd, 5% fat	1/1/2	1.10 \pm 0.06	0.09 \pm 0.01	2.54 \pm 0.16	nd
Custard, 4.1% fat	1/1/2	1.35 \pm 0.13	0.21 \pm 0.03	1.55 \pm 0.14	nd
Caramel cream ^b , 5% fat	1/3/5	1.54 \pm 0.21	nd	14.76 \pm 2.04	4.86 \pm 1.28
Cream, 35% fat	3/2/2	9.32 \pm 4.33	2.29 \pm 1.06	13.58 \pm 5.29	nd
Cheese, Petit Suisse-type 3.8% fat	1/1/2	1.33 \pm 0.05	0.28 \pm 0.04	1.94 \pm 0.19	nd
Cheese, Burgos-type 12.1–17% fat	2/1/2	2.89 \pm 0.36	0.36 \pm 0.06	4.45 \pm 0.62	nd
Cheese, individual portions 12.4% fat	1/1/1	3.18 \pm 0.19	1.05 \pm 0.03	4.43 \pm 0.44	nd
Cheese, semi-cured/cured 45–50% fat	3/1/2	9.04 \pm 1.65	nd	13.48 \pm 3.53	nd
Butter 83% fat	2/2/2	30.06 \pm 10.22	8.85 \pm 0.96	30.59 \pm 8.06	nd
A + D + E-fortified margarine 40% fat	1/1/1	19.52 \pm 3.36	22.68 \pm 0.61	143.38 \pm 35.06	166.52 \pm 25.19
A + D + E-fortified margarine 62% fat	1/2/3	10.98 \pm 3.49	19.70 \pm 2.52	240.18 \pm 123.92	110.21 \pm 59.29

^and not detected at detection limit 0.03 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mmol kg^{-1} (retinol and β -carotene) and 0.23 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mmol kg^{-1} (α , γ -tocopherol).

^bIt contains lutein and zeaxanthin (0.58 \pm 0.04 and 0.62 \pm 0.04 $\mu\text{mol kg}^{-1}$, respectively).

with food-related factors such as breed, geographical origin, feed or seasonality (Indyk, Lawrence, & Broda, 1993), accurate identification of the items (i.e. cheese), composition of mixed products (i.e. caramel cream), processing and storage conditions (i.e. cured cheese) and/or varying standards legislated in each country (i.e. fortified products) (Hicks et al., 1996; Granado et al., 1997; Murphy et al., 2001; Serra-Majem et al., 2001).

Values obtained for fortified fluid milks (Table 1) show an important variability in the vitamin A and E content in these products, coinciding with reports on fortification compliance in fluid milks (Hicks et al., 1996; Murphy et al., 2001). In the present study, considering the content specified in the label claims (4.19 and 34.83 μmol for vitamin A and E, respectively), mean concentrations obtained ranged from 79% to 206% for retinol and from 6% to 141% for α -tocopherol of those claimed. Although these values are the sum of natural and added vitamins, the quantities added (such as acetate) showed a high variability between units, lots and dairy processing plants, regardless of the fat content in the fluid milk (whole, low-fat or skim). In our study, over-fortification predominated in the samples analysed. However, we also observed (data not shown) that over- and under-fortification can both be present in the same unit(s) and/or lot(s), suggesting different sources of error for each vitamin.

There are many factors that can affect the final vitamin concentration in fortified foods, including temperature, light, pH, storage conditions, etc. (de Jong, Adam, de Groot, & de Graaf, 2000). However, lack of compliance with regard to vitamin-fortification in fluid milks is not infrequent among dairy processing plants, a fact that has been associated mainly with processing errors (Hicks et al., 1996; Murphy et al., 2001). In our country, legal guidelines for vitamin fortification in foods only establish that the quantities added should provide at least 15% and no more than 100% of the RDI (BOE, 2003). However, keeping in mind the nutritional purposes of these foods, it should be noted that compliance in vitamin fortification is essential to ensure vitamin intake and to avoid potential harmful effects in target groups. In addition, the wide variation observed in commercially available natural and vitamin-fortified dairy products may be an important source of bias and imprecision in nutritional studies.

Acknowledgements

This work was funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spain (FIS 98/0386). The authors are indebted to Martha Messman for preparing the manuscript.

References

- Albalá-Hurtado, S., Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., & Mariné-Font, A. (1997). Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 778(1–2), 243–246.
- Barr, S. I., & McCarron, D. A. (2000). Effects of increased consumption of fluid milk on energy and nutrient intake, body weight, and cardiovascular risk factors in healthy older adults. *Journal of the American Dietetic Association*, 100(7), 810–817.
- Berner, L. A., Clydesdale, F. G., & Douglass, J. S. (2001). Fortification contributed greatly to vitamin and mineral intakes in the United States, 1989–1991. *Journal of Nutrition*, 131, 2177–2183.
- Blanco, D., Fernández, M. P., & Gutiérrez, M. D. (2000). Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in dairy products by liquid chromatography with a narrow-bore column. *Analyst*, 125, 427–431.
- BOE (Boletín Oficial del Estado), (2003). *Real Decreto 1275/200*, Madrid.
- Dary, O., & Mora, J. O. (2002). Food fortification to reduce vitamin A deficiency: international vitamin A consultative group recommendations. *Journal of Nutrition*, 132, 2927S–2933S.
- de Jong, N., Adam, S. G. M., de Groot, L. C. P. G. M., & de Graaf, C. (2000). Variability of micronutrient content in enriched dairy and fruit products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51, 247–257.
- Gamiz-Gracia, L., Velasco-Arjona, A., & Luque de Castro, M. D. (1999). Fully automated determination of vitamins A and E in milk-based products using a robotic station-HPLC arrangement. *Analyst*, 124(5), 801–804.
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I., & Rojas-Hidalgo, E. (1991). An improved HPLC method for the separation of fourteen carotenoids, including 15-/13- and 9 cis-a-carotene isomers, phytoene and phytofluene. *Journal of Liquid Chromatography*, 14(13), 2457–2475.
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I., Gil-Martínez, E., & Rojas-Hidalgo, E. (1997). Variability in the intercomparison of food carotenoid content data: a user's point of view. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(7), 621–633.
- Herrero, C., Granado, F., Blanco, I., & Olmedilla, B. (2002). Vitamin A and E content in dairy products: their contribution to the recommended dietary allowances (RDA) for elderly people. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 6(1), 57–59.
- Hicks, T., Hansen, A. P., & Rushing, J. E. (1996). Procedures used by North Carolina dairies for vitamins A and D fortification of milk. *Journal of Dairy Science*, 79, 329–333.
- Holden, J. M., Eldridge, A. L., Beecher, G. R., Buzzard, M., Bhagwat, S., Davis, C. S., Douglass, L. W., Gebhart, S., Haytowitz, D., & Schakel, S. (1999). Carotenoid content of US Foods: an update of the database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 169–196.
- Indyk, H. E., Lawrence, R., & Broda, A. D. (1993). The micronutrient content of bovine whole milk powder: influence of pasture feeding and season. *Food Chemistry*, 46, 389–396.
- INE (Instituto Nacional de Estadística) (1995). *Encuesta de presupuestos familiares 1990–1991*, Madrid.
- Institute of Medicine (2001). National Academy of Sciences. *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc*. Washington DC: National Academy Press.
- Jensen, S. K., & Nielsen, K. N. (1996). Tocopherols, retinol, β -carotene and fatty acids in fat globule membrane and fat globule core in cows' milk. *Journal of Dairy Research*, 63, 565–574.
- Mataix, J. & Manas, M. (1998). *Tablas de composición de alimentos españoles*. Universidad de Granada.
- McCance & Widdowson's (1998). *Food composition tables*. (4^a Edición). Amsterdam, Elsevier.

- Moreiras, O., Carvajal, A., & Cabrera, L. (1996). *Tablas de composición de alimentos*. Ediciones Pirámide.
- Murphy, S. C., Whited, L. J., Rosenberry, L. C., Hammond, B. H., Bandler, D. K., & Boor, K. J. (2001). Fluid milk vitamin fortification compliance in New York State. *Journal of Dairy Science*, 84, 2813–2820.
- Ollilainen, V., Heinonen, M., Linkola, E., Varo, P., & Koivistonon, P. (1989). Carotenoids and retinoids in Finnish foods: dairy products and eggs. *Journal of Dairy Science*, 72, 2257–2265.
- Olmedilla, B., Granado, F., Gil-Martínez, E., Blanco, I., & Rojas Hidalgo, E. (1997). Reference values for retinol, tocopherol, and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. *Clinical Chemistry*, 43(6), 1066–1077.
- Panfili, G., Manzi, P., & Pizzoferrato, L. (1994). High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of tocopherols, carotenes, and retinol and its geometric isomers in Italian cheeses. *Analyst*, 119(6), 1161–1165.
- Salvini, S., Parpinel, M., Gnagnarella, P., Maisonneuve, P., & Turrini, T. (1998). *Banca Dati di Composizione degli Alimenti per Studi Epidemiologici in Italia*. Instituto Europeo de Oncología.
- Serra-Majem, L., Ortega, R., Aranceta, J., Entrala, A., & Gil, A. (2001). Fortified foods: criteria for vitamin supplementation in Spain. *Public Health Nutrition*, 4(6A), 1331–1334.
- Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, H. (1989). *Food composition and nutrition tables 1989/90*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Stancher, B., & Zonta, F. (1982). High performance liquid chromatographic determination of carotene and vitamin A and its geometric isomers in food. Application to cheese analysis (pp. 217–225). *Chrom.* Netherlands, Elsevier: 14.566.
- Turner, C., King, J. W., & Mathiason, L. (2001). On-line supercritical fluid extraction/enzymatic hydrolysis of vitamin A esters: a new simplified approach for the determination of vitamins A and E in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 553–558.

Carmen Herrero-Barbudo
Begoña Olmedilla-Alonso
Fernando Granado-Lorencio
Inmaculada Blanco-Navarro

Bioavailability of vitamins A and E from whole and vitamin-fortified milks in control subjects

■ **Abstract** *Background* Dairy products fortified with vitamins and minerals represent a growing market that is of interest to those sectors of the population with unbalanced diets and increased needs. However, there is little information on the bioavailability of micronutrients in milk products

Received: 17 January 2006
Accepted: 6 July 2006
Published online: 28 September 2006

C. Herrero-Barbudo · F. Granado-Lorencio
I. Blanco-Navarro
Servicio de Endocrinología y Nutrición
Unidad de Vitaminas
Hospital Universitario Puerta de Hierro
C/ San Martín de Porres, 4
28035 Madrid, Spain

B. Olmedilla-Alonso (✉)
Instituto del Frío
CSIC
Madrid, Spain
Tel.: +34-91/344-5447 or 5448
Fax: +34-91/344-5116
E-Mail: bolmedilla@if.csic.es
or bolmedilla@telefonica.net

at dietary intake levels. *Aim of the study* To evaluate the bioavailability of vitamins A and E in whole milk and fortified whole and skimmed milk in control subjects. *Methods* A single-dose bioavailability study was performed using three commercially available milks (unfortified whole milk and whole and skimmed milk fortified with vitamins A and E). Nineteen volunteers (10 women and 9 men) ingested 430 ml of each milk on different days. The contents of retinol and α -tocopherol provided in the milks and the retinyl esters and α -tocopherol in triglyceride-rich lipoprotein fractions (TRL) from plasma collected for 6.5 h postprandially were assayed using a quality-controlled HPLC method. The relative absorption of vitamins A and E from milks was calculated on the basis of area under the curve (AUC) versus time curve estimations, adjusted for plasma volume and expressed

as percentage of the amount of nutrient provided. *Results* The total amounts of retinol and α -tocopherol provided ranged between 0.48 and 4.15 μmol and 0.41 and 32.49 μmol , respectively. The AUC value of retinyl palmitate in TRL was higher for fortified whole milk than for the other two milks (unfortified whole and fortified skimmed milk). The percent relative absorption of vitamin A did not differ among the three types of milk. The AUC for α -tocopherol was no different after the ingestion of any of these milks. *Conclusion* The mean percentage of retinol absorption was apparently similar for the three types of milk, regardless of the amount of fat ingested with each type of milk and the vitamin A provided.

■ **Key words** bioavailability – vitamin A – vitamin E – milk – humans

Introduction

Milk is an effective delivery vehicle for fat-soluble vitamins, has a long-standing tradition of safety, and is a widely accepted food for enhancing normal growth and development [1]. It is a good source of certain fat-soluble vitamins (i.e., vitamin A), and the fortification of frequently consumed foods has been proven to be an effective and low-cost way to increase

the micronutrient supply and reduce the incidence of micronutrient deficiencies [2–6].

A number of factors can influence the final vitamin content in a food, whether related to the treatments and transformations to which the food is subjected in its preparation for consumption or to the storage conditions, and some of these factors may affect the bioavailability of the micronutrients [7]. Moreover, there are several factors that can influence the bio-

Table 1 Characteristics of the subjects at entrance (9 men, 10 women)

Characteristics	Mean \pm SD
Age (years)	22.2 \pm 3.0
Body mass index (kg/m ²)	22.3 \pm 2.0
Total cholesterol (mmol l ⁻¹)	4.4 \pm 0.8
HDL-c (mmol l ⁻¹)	1.5 \pm 0.4
LDL-c (mmol l ⁻¹)	2.6 \pm 0.8
Triglycerides (mmol l ⁻¹)	0.7 \pm 0.5
Serum retinol (μ mol l ⁻¹) ^a	1.76 ^a \pm 0.4
Serum retinyl palmitate (nmol l ⁻¹)	7.1 \pm 4.8
Serum α -tocopherol (μ mol l ⁻¹)	24.4 \pm 4.1

HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c: low-density lipoprotein cholesterol.

^a1.9 and 1.4 μ mol l⁻¹ in men and women, respectively.

availability of vitamins, some of them associated with the individual (nutritional status, age, and lifestyle) [8–10], while others are related to the food (matrix effect, amount of fat, molecular bonds, amount consumed, and chemical forms of the nutrient) [7, 11–13].

Data on the bioavailability of micronutrients (natural or added) from dairy products in humans are very limited and, to our knowledge, only refer to vitamin B12 and folic acid [14, 15], and there is no information related to vitamins A and E. In this context, our aim was to evaluate the bioavailability (relative absorption) of vitamins A and E from commercially available whole and fortified milks in control subjects.

Methods

Study design, subjects, and types of milk

The bioavailability study consisted of a single-dose pharmacokinetic assay involving three types of commercially available milk: whole milk, whole milk fortified with vitamins A and E, and skimmed milk fortified with vitamins A and E. The three types of milk were consumed by all the subjects at 1-week intervals.

Nineteen apparently healthy volunteers (9 men and 10 women) were enrolled in this bioavailability study. Inclusion criteria were: 20–31 years of age, body mass index of 20–25 kg/m² and serum retinol and α -tocopherol levels >1.05 and >20 μ mol l⁻¹, respectively, indicative of adequate nutritional status and body reserves. Exclusion criteria included consumption of vitamin and mineral supplements, habitual use of drugs or oral contraceptives, dieting, pregnancy, lactation, high-intensity exercise, or chronic or metabolic diseases. The characteristics of the volunteers at the beginning of the study are shown in Table 1.

The volunteers were asked to consume a retinol and provitamin-A-carotenoid-free diet (with the aid of a list of foods that was given to them) over the 24 h preceding each assay in order to reduce possible interferences from previous meals. This length of time was considered to be sufficient to “wash” the intestine by mobilizing any chylomicron particles containing retinol and provitamin A carotenoids from previous meals [16]. After an overnight fast, the volunteers were cannulated and blood samples collected before breakfast (baseline). For the three assays, a common breakfast, consisting of 430 ml of milk plus 10 unfortified biscuits, was provided. The volunteers were asked to consume the breakfast within 10 min, after which blood samples were taken 90 min later and hourly for 5 h.

The three milks were of the same commercial brand (with a high market share) and the fortified milks also contained vitamin D, folic acid, calcium, and phosphorus. The contents of vitamins A and E in the fortified milks were, as specified in the nutrition facts label, 120 μ g/100 ml (4.2 μ mol l⁻¹) and 1.5 mg/100 ml (34.83 μ mol l⁻¹), respectively.

The study procedures were performed in accordance with the Ethical Committee for Clinical Investigation of Hospital Universitario Puerta de Hierro. Subjects were informed about the study and gave their written consent.

Reagents and chromatography

All-*trans*-retinol, retinyl acetate, retinyl palmitate, α -tocopherol, tocopheryl acetate, and ammonium acetate were purchased from Sigma Chemical Co. (Spain). Butylated hydroxytoluene (BHT), potassium hydroxide (KOH), pyrogalllic acid, tetrahydrofuran, isopropanol, and water (HPLC grade) were obtained from Carlo Erba (Spain). Ethanol, hexane, acetonitrile, methanol, methylene chloride (HPLC grade), and sodium chloride were from Merck (Spain). Reference materials for the analysis of milks were Infant Formula (SRM 1846) from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA) and whole milk powder (CRM 421) from the Laboratory of the Government Chemist (LGC, Teddington, UK).

An ALC/GPC chromatograph (Model 201, Waters Associates, Milford, MA, USA) equipped with a M45 pump, manual injector (Rheodyne) and a data acquisition system (Millenium Station, Waters Assoc., Milford, MA, USA) was used. The chromatographic system consisted of a Spheri-5-ODS column (Brownlee Applied Biosystems, San José, CA, USA) (5 μ m, 4.6 mm \times 220 mm) with RP-18 guard column (7 μ m) with acetonitrile/methylene chloride/methanol (70:20:10, v/v/v) in isocratic elution at a flow rate of 1.3 ml min⁻¹ [17]. Ammonium acetate (0.025 M) was

added to the methanol. Analytes were detected with a photodiode array detector (PDA 996, Waters Assoc., Milford, MA, USA) set at 326 nm for retinol and retinyl esters and 295 nm for α -tocopherol and tocopheryl acetate. Retinol, retinyl acetate, retinyl palmitate, α -tocopherol, tocopheryl acetate, and β -carotene were identified by comparing their retention times and on-line UV-spectra with those of authentic standards, and quantified against standard calibration curves. Other retinyl esters were identified by absorption spectra and quantified, together with retinyl palmitate, using the retinyl palmitate curve.

Analysis of vitamins A and E in the milks

Aliquots of the milks provided to the volunteers were collected and analyzed (in quadruplicate) for vitamins A and E content on the same day of the study. These samples were processed simultaneously by two extraction protocols (with and without previous alkaline hydrolysis of the matrix) to assess both the chemical forms and the total content of the vitamins, as previously described [18]. Quality control was performed using reference materials for milk analyses (from NIST [USA] and LGC [UK]) and the results obtained with the method were in good agreement with the certified values.

Analysis of vitamins A and E in triacylglycerol-rich lipoproteins fractions

Triacylglycerol-rich lipoprotein fractions (TRL) were prepared from plasma (EDTA 7.5%) according to the protocol described by Griffiths et al. [19]. Plasma obtained within 20 min of blood collection was stored at -20°C until analysis. After slow thawing at 4°C , duplicate 0.5 ml samples of plasma from each time-point were transferred to Eppendorf tubes, overlaid with saline solution (density 1.006 kg l^{-1}) and centrifuged at 12,600g for 2 h. The upper layers (TRL fraction) were carefully aspirated, the duplicates were pooled and vitamins A and E were extracted as described elsewhere [20]. Briefly, the TRL fractions obtained from 1 ml of plasma were mixed with 1 ml of ethanol, vortexed and extracted twice with 1.5 ml of methylene chloride/hexane (1:5). The organic phases were pooled, evaporated to dryness and reconstituted with tetrahydrofurane/ethanol (1:1) to be injected onto the HPLC. Using the protocols described, quantification limits were less than 6 nmol l^{-1} for retinol, $<1.1\text{ nmol l}^{-1}$ for retinyl palmitate, and $<90\text{ nmol l}^{-1}$ for α -tocopherol.

The short-term and long-term precision and accuracy of the analytical method was within accepted

values, as verified periodically through our participation in the Fat-Soluble Quality Assurance Programme conducted by the National Institute of Standards and Technology (NIST; Gaithersburg, MD, USA).

Statistical analysis

The baseline characteristics of the subjects and the vitamins A and E content in milk and in TRL are expressed as the mean plus or minus standard deviation. The normal distribution of the data was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test and the differences between subjects at the beginning of the study by means of Student's *t* test. Except for serum retinol levels, there were no statistically significant differences between men and women at baseline.

The areas under the curves (AUC) of the postprandial responses in TRL fractions versus time were calculated by the trapezoidal method after correction for baseline concentrations. There was no difference between sexes regarding the AUC for the three types of milk (ANOVA) and, thus, the men and women were grouped for the subsequent analyses. Differences in postprandial retinyl esters and α -tocopherol concentrations in TRL fractions after the ingestion of the three types of milk were estimated by paired samples *t* test to assess statistical differences ($p < 0.05$) between groups.

Percentages of relative absorption during the period of study (6.5 h) were calculated on the basis of the AUC values for retinyl esters and α -tocopherol in TRL fractions, correcting for plasma volume (assuming 4% body weight) [21], and expressed against the dose supplied for each type of milk, as determined by HPLC analysis.

Due to the discrepancies between the vitamin content of the milks used as specified in the nutritional label and that determined using a quality-controlled method in our lab, the final percent relative absorption was calculated using the total amount of vitamins as quantified in our laboratory.

Results

■ Vitamins A and E content in milks used in the bioavailability studies

Vitamins A and E, chemical forms, content, and amounts provided in the study are shown in Table 2. As mentioned in the "Methods" section, the retinol and α -tocopherol contents did not match those reported in the nutritional label; the vitamin E con-

Table 2 Retinol and α -tocopherol content of the milks used in the study

Milk	Chemical forms of vitamin A	Retinol content ($\mu\text{mol l}^{-1}$) (mean \pm SD)	Retinol supplied ($\mu\text{mol}/430 \text{ ml}$) (range)	Chemical forms of vitamin E	α -Tocopherol content ($\mu\text{mol l}^{-1}$) (mean \pm SD)	α -Tocopherol supplied ($\mu\text{mol}/430 \text{ ml}$) (range)
Whole ($n = 3$) ^a	Retinyl palmitate	1.46 \pm 0.36	0.48–0.92	α -Tocopherol	1.87 \pm 0.63	0.41–1.08
Fortified whole ^b (3.6% fat) ($n = 4$)	Retinyl palmitate and acetate	7.39 \pm 1.35	2.19–4.15	α -Tocopherol tocopheryl acetate	53.03 \pm 12.48	16.78–32.49
Fortified skimmed ^b (0.3% fat) ($n = 3$)	Retinyl acetate	3.33 \pm 0.82	1.08–1.99	α -Tocopherol tocopheryl acetate	45.14 \pm 12.63	11.01–27.53

^aNumber of cartons analyzed.^bContent as specified on the nutritional label: 4.2 μmol retinol l^{-1} and 34.9 μmol α -tocopherol l^{-1} .

centration was higher in both fortified milks, while the vitamin A content was higher in the fortified whole milk and lower in the fortified skimmed milk. The presence of β -carotene in all the milks used was negligible and, for this reason, only free retinol and retinyl esters were used for calculations of the vitamin A absorption.

■ Postprandial response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction (TRL)

Following the consumption of the three types of milk, the concentrations of retinyl palmitate and other long-chain retinyl esters increased in the TRL fractions during the postprandial period. Regardless of the type of milk consumed, the concentration of retinyl palmitate in TRL peaked at ca. 3 h after consumption, and baseline levels were recovered at the end of the period monitored (6.5 h).

The increment in retinyl esters differed depending on the type of milk consumed. As can be seen in Fig. 1, the maximum concentrations reached (after correction for baseline concentrations) after ingestion varied from one type of milk to another. Fortified whole milk provoked an increase of 31.7 nmol retinyl esters l^{-1} (95% CI: 15.8 and 47.9; $p = 0.001$), greater than that of whole milk, as could be expected, since fortified whole milk provides four times more retinol than unfortified whole milk (Table 2). In contrast, skimmed milk plus vitamins resulted in an increase of 7.8 nmol l^{-1} (95% CI: 3.12 and 12.6; $p = 0.003$) over that observed with whole milk, despite the fact that fortified skimmed milk provides twice as much retinol as whole milk (Table 2).

The comparison of the response to the ingestion of the two fortified milks in terms of retinyl esters shows that fortified whole milk provoked a greater increase in their concentration (24.06 nmol l^{-1} 95% CI: 9.7 and 38.3; $p = 0.002$) than fortified skimmed milk, a circumstance that is in accordance with the nearly twofold higher retinol content in fortified whole milk (Table 2).

The AUC corresponding to the response of retinyl esters in TRL for the three assays are shown in Table 3. The most marked response was observed for vitamin-fortified whole milk and the least marked for unfortified whole milk. However, when the AUC response was adjusted for the vitamin A provided to the volunteers, the response in TRL for the three types of milk did not differ significantly (Fig. 2). Similarly, although the absorption ranged widely for all the milks (Table 3), the mean percent absorption was apparently similar for the three types, regardless of the amount of fat ingested with each (i.e., whole

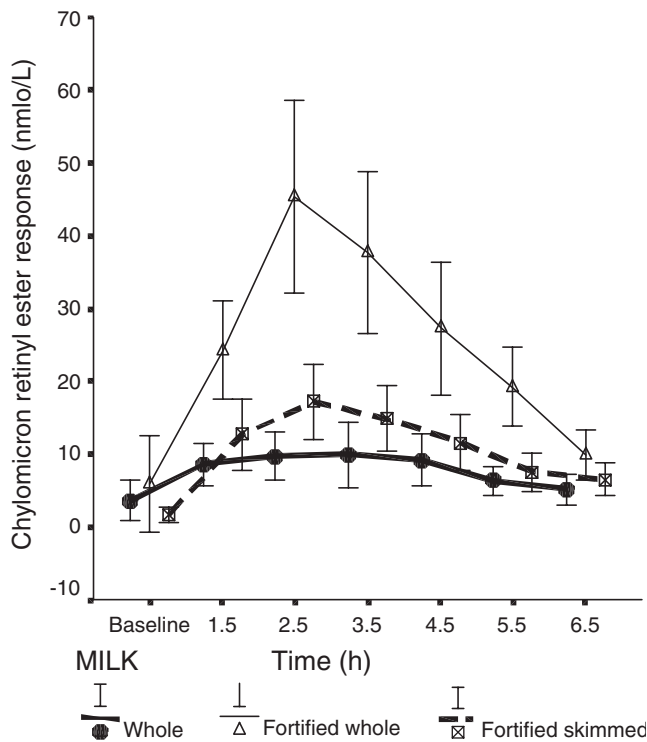


Fig. 1 Retinyl ester response during the postprandial period after the intake of different types of milk. Mean (95% CI)

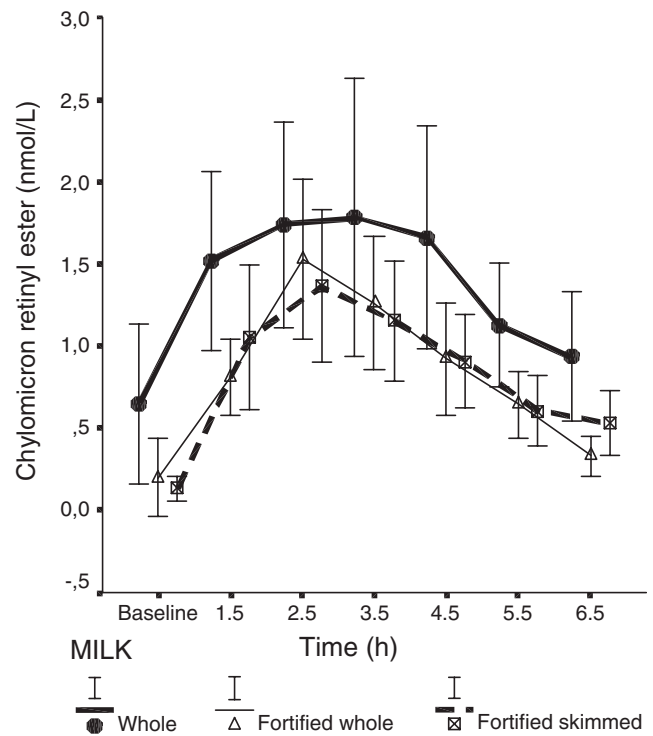


Fig. 2 Dose-adjusted response of retinyl esters in TRL fractions. Mean (95% CI)

versus skimmed) and the amount of vitamin A provided (ca. 0.5–4.0 $\mu\text{mol}/430\text{ ml}$ milk).

Between-subject variability in vitamin A response, and thus absorption, was high for the three types of milk (67% for whole milk, 57% for fortified whole milk, and 78% for fortified skimmed milk). Within-subject variability in vitamin A response was 38.5% (95% CI: 28.7 and 48.4) for the three types of milk and significant correlations were observed, especially between the two fortified milks (Spearman $r = 0.753$, $p < 0.001$).

For α -tocopherol, the response in the TRL fractions during the postprandial period did not differ with respect to the baseline at any time-point of the study for any of the milks consumed. Regardless of the dose provided with each milk, the AUC values for α -tocopherol ranged between 1200 and 1400 $\text{nmol}/\text{l}^{-1}/\text{h}^{-1}$, with a wide within-group variability, and no significant differences were observed in the AUCs corresponding to the three milks.

Discussion

Our study provides information on the absorption of two fat-soluble vitamins (A and E) from whole milk and fortified whole and skimmed milks. At the present time, there is very little information on the bioavailability of vitamins from dairy products, and what information there is focuses on vitamin B12 and folic acid [14, 15]. In our study, the amounts of vitamins A and E ingested were nutritional quantities, not pharmacological doses, and they were provided by a “standard” breakfast, not in concentrates or capsules, a circumstance that differs with respect to previous reports [13, 22, 23].

Stable isotope dilution techniques are considered more accurate and less speculative for the study of nutrient bioavailability, although this approach also has certain disadvantages, such the costs associated with the necessary methodology and the concern as to

Table 3 Response of retinyl esters in TRL fractions during the postprandial period ($n = 19$)

Milk type	AUC ($\text{nmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (mean \pm SD)	C_{max} (nmol l^{-1})	Time C_{max} (h)	%Mean absorption (95% CI)
Whole (3.6% fat)	5.4 ± 3.7	10.0 ± 7.0	3.0 ± 1.1	16.4 (11.04–21.7)
Fortified whole (3.6% fat)	22.9 ± 10.6	47.8 ± 24	3.0 ± 0.8	13.6 (9.9–17.4)
Fortified skimmed (0.2% fat)	9.3 ± 5.5	18.3 ± 10.8	2.7 ± 0.9	13.4 (8.4–18.4)

whether the labeled forms undergo absorption and metabolism to the same extent as the endogenous forms. Thus, considering the aim of the present study, i.e., the study of the bioavailability of vitamins A and E from commercially available milks, the use of (intrinsically or extrinsically) labeled vitamins would have been difficult to address and was not among our objectives. An alternative approach is the study of TRL fractions since they represent newly absorbed lipids from recent meals [16, 19]. In this respect, although we did not characterize the TRL fraction and, thus, cannot assure that the entire fraction was isolated, these fractions provided a retinyl ester profile clearly indicative of intestinal origin in the postprandial period (several long-chain fatty acid esters with palmitate representing about two-third of the total), constituting at least qualitative evidence of the nature of the isolated fraction.

It should be pointed out that, in this study, the amounts of the nutrients ingested, as well as the chemical forms of the vitamins present in the different types of milk, were determined on the same day of the assay. This is important since the analysis of the vitamin content in these milks demonstrated a wide variability with respect to that indicated on the label, a circumstance that we had observed in previous analyses using fortified milk [18], coinciding with findings reported by other authors [24, 25].

Interestingly, in this bioavailability assay, the times within which the maximum concentration and subsequent restoration of baseline levels were reached also agreed with those reported elsewhere [23, 26], although in the latter studies, the amounts of nutrients ingested were pharmacological doses and the quantity of fat ingested was also much greater than in our study. Previous studies have reported percentages of absorption of more than 70% [27, 28] or less than 75% [11, 29], depending on the quantity and quality of the fat ingested with the nutrient. In our case, the percentages of relative absorption of vitamin A from the three types of milk were lower, between 2% and 44%. However, it should be noted that the available data on the percent absorption of vitamin A refer to capsules and, in these cases, since the chemical compound is not in the interior of a structure (matrix), the nutrient will be more accessible and, thus, more bioavailable to the organism.

Another factor that can influence the absorption of vitamins is the amount of nutrient ingested [11]. At higher intakes, the absorption capacity is lower owing to limited micellar incorporation, limited capacity for intracellular translocation and limited incorporation into chylomicrons [7]. In our study, the postprandial response of retinyl esters in the TRL fraction was related to the amount provided, except in the case of

fortified skimmed milk, in which, as we indicated above, the amount of fat ingested is lower.

The bioavailability of fat-soluble vitamins from the diet is also greatly influenced by fat, since it can provide a hydrophobic environment in which these compounds can become solubilized, and contribute to the stimulation of biliary secretion and, consequently, to the formation of micelles and to the increase in the amount of fat-soluble compounds available for their absorption [7]. However, researchers do not agree with respect to the influence of dietary fat on vitamin absorption. Some studies indicate that the amount of fat ingested in the diet favors the absorption of certain vitamins and related compounds [13], while other authors have observed that vitamin absorption is similar regardless of the consumption of diets with high or low fat content (3–30 g of fat) [22, 30]. In our study, the approximate amount of fat provided (according to the nutritional labels) in the breakfast ranged between 6.2 and 20.8 g, depending on the type of milk ingested (skimmed or whole, respectively). When we compared the increase in the retinyl ester concentration at the different time points after the ingestion of fortified skimmed milk with that observed with unfortified whole milk, the response produced was similar, despite the fact that the amount of nutrient provided was greater with the fortified milk. It could be, in this case, that the low amount of fat influences vitamin A absorption. In addition, despite the fact that the mean percent absorption was apparently similar for the three types of milk, this percentage showed a great within-subject and between-subject variability (60–80%), the latter possibly related to individual differences in fat absorption and/or clearance [11].

On the other hand, some authors affirm that the intake of vitamins A and E in different chemical forms (natural or synthetic) influences the percent absorption, which, in the case of vitamin E, is higher with natural forms than with synthetic preparations [1, 7, 13, 31]. However, the bioavailability of vitamin A when assessed in terms of the different retinyl esters (for example, acetate or palmitate) does not differ [11], a fact that is consistent with our results in the sense that, under the assay conditions (dose, fat, chemical forms), the percentages of relative absorption of vitamin A from the different types of milk was not significantly different.

With respect to vitamin E, the percentages of absorption obtained with the larger quantities provided by capsules ranged between 10% and 95% [1, 30, 32–34], differences that may be due to the variety of experimental and methodological conditions applied in the studies [32]. In our study, the analysis of the TRL fractions did not show a significant increase in α -tocopherol during the postprandial period following the ingestion of any of the milks assayed, a fact that

impeded us from calculating the percent absorption. It could be that the amount of nutrient provided by these three types of milk was insufficient to provoke an evaluable response. In fact, in other studies of the bioavailability of vitamin E in humans [13, 22], an increase in the levels of α -tocopherol in chylomicrons was observed after the ingestion of 300 μ mol of vitamin E (in the form of tocopheryl acetate), a much greater amount than that provided in our study with the three types of milk (tocopherol, 0.41–32.19 μ mol). However, the response does not appear to depend solely on the amount of nutrient since, using higher amounts, Jeanes et al. [13] did not find variations in the concentrations of labeled α -tocopherol in chylomicrons when the capsule was taken with skimmed milk or with water. Thus, the apparent lack of re-

sponse in the present study could be attributable, at least in part, to a combination of different factors, including the amount of nutrient ingested, amount of fat, chemical forms of the nutrient, etc.

In summary, the amounts of retinol absorbed from milk increase in relation to the amount provided although the mean percent relative absorption is apparently similar for whole and fortified milks, regardless of the amount of fat ingested with each type of milk (i.e., whole versus skimmed) and the vitamin A provided.

■ **Acknowledgments** This work was funded by the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 98/0386) and Instituto de Salud Carlos III (RCMN C03/08), Spain.

References

1. Hayes KC, Pronczuk A, Perlman D (2001) Vitamin E in fortified cow milk uniquely enriches human plasma lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 74:211–8
2. Barr SI, McCarron DA (2000) Effects of increased consumption of fluid milk on energy and nutrient intake, body weight, and cardiovascular risk factors in healthy older adults. *J Am Diet Assoc* 100(7):810–817
3. Berner LA, Clydesdale FG, Douglass JS (2001) Fortification contributed greatly to vitamin and mineral intakes in the United States, 1989–1991. *J Nutr* 131:2177–2183
4. Serra-Majem L, Ortega R, Aranceta J, Entrala A, Gil A (2001) Fortified foods: criteria for vitamin supplementation in Spain. *Pub Health Nutr* 4(6A):1331–1334
5. Dary O, Mora JO (2002) Food fortification to reduce vitamin A deficiency: international vitamin A consultative group recommendations. *J Nutr* 132:2927S–2933S
6. Herrero C, Granado F, Blanco I, Olmedilla B (2002) Vitamin A and E content in dairy products: their contribution to the recommended dietary allowances (RDA) for elderly people. *J Nutr Health Aging* 6(1):57–59
7. Borel P (2003) Factors affecting intestinal absorption of highly lipophilic food microconstituents (fat-soluble vitamins, carotenoids and phytosterols). *Clin Chem Lab Med* 41(8):979–994
8. Kelleher J, Losowsky MS (1970) The absorption of α -tocopherol in man. *Br J Nutr* 24:1033–47
9. Van den Berg H (1993) General aspects of bioavailability of vitamins. In: Schlemmer U (ed) *Bioavailability '93: Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient bioavailability* (2nd part), Bundesforschungsanstalt für Ernährung, pp 267–278
10. Van den Berg H, Van der Gaag M, Hendriks H (2001) Influence of lifestyle on vitamin bioavailability. *Int J Vitam Nutr Res* 72 (1):53–59
11. Biesalski HK (1997) Bioavailability of vitamin A. *Eur J Clin Nutr* 51(Suppl):S71–S75
12. Jalal F, Nesheim MC, Agus Z, Sanjur D, Habicht JP (1998) Serum retinol concentrations in children are affected by food sources of β -carotene, fat intake, and anthelmintic drug treatment. *Am J Clin Nutr* 68:623–629
13. Jeanes YM, Hall WL, Ellard S, Lee E, Lodge JK (2004) The absorption of vitamin E is influenced by the amount of fat in a meal and the food matrix. *Br J Nutr* 92(4):575–579
14. Russell RM (2001) Older men and women efficiently absorb vitamin B-12 from milk and fortified bread. *J Nutr* 131:291–293
15. de Jong RJ, Verwei M, West CE, Van Vliet T, Siebelink E, van den Berg H, Castenmiller JJ (2005) Bioavailability of folic acid from fortified pasteurised and UHT-treated milk in humans. *Eur J Clin Nutr* 59(8):906–13
16. Fielding B, Callow J, Owen RM, Samra J, Mathews DR, Frayn KN (1996) Postprandial lipemia: The origin of an early peak studied by specific dietary fatty acid intake during sequential meals. *Am J Clin Nutr* 63:36–41
17. Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas-Hidalgo E (1991) An improved HPLC method for the separation of fourteen carotenoids, including 15-/13- and 9 *cis*- β -carotene isomers, phytoene and phytofluene. *J Liq Chromatogr* 14(13):2457–2475
18. Herrero-Barbudo C, Granado-Lorencio F, Blanco-Navarro B, Olmedilla-Alonso B (2005) Retinol, α and γ -tocopherol and carotenoids in natural and vitamin A and E-fortified dairy products commercialized in Spain. *Int Dairy J* 15(5):521–526
19. Griffiths AJ, Humphreys SM, Clark ML, Frayn K (1994) Immediate metabolic availability of dietary fat in combination with carbohydrates. *Am J Clin Nutr* 59:1025–1032
20. Olmedilla B, Granado F, Gil-Martínez E, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. (1997) Reference values of retinol, α -tocopherol and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. *Clin Chem* 43(6):1066–1071
21. Geigy JR (1962) Scientific tables. In: Konrad Diem (ed), pp 547–548
22. Borel P, Mekki N, Boirie Y, Partier A, Grolier P, Alexandre-Gouabau MC, Beaufriere B, Armand M, Lairon D, Azais-Braesco V (1997) Postprandial chylomicron and plasma vitamin E responses in healthy older subjects compared with younger ones. *Eur J Clin Invest* 27:812–821

23. Borel P, Mekki N, Boirien Y, Partier A, Alexandre-Gouabau MC, Grolier P, Beaufriere B, Portugal H, Lairon D, Azais-Braesco V (1998) Comparison of the postprandial plasma vitamin A response in young and older adults. *J Gerontol* 53A(2):B-133-140
24. Hicks T, Hansen AP, Rushing JE (1996) Procedures used by North Carolina dairies for vitamins A and D fortification of milk. *J Dairy Sci* 79:329-333
25. Murphy SC, Whited LJ, Rosenberry LC, Hammond BH, Bandler DK, Boor KJ (2001) Fluid milk vitamin fortification compliance in New York State. *J Dairy Sci* 84:2813-2820
26. Renuka KD, Silva R, Williams MC, Lovegrove JA (2001) Use of water-miscible retinyl palmitate as markers of chylomicrons gives earlier peak response of plasma retinyl esters compared with oil-soluble retinyl palmitate. *Br J Nutr* 86:427-432
27. Blomhoff R (1994) Overview of vitamin A metabolism and function. In: Blomhoff R (ed) *Vitamin A in health and disease*. Dekker, New York, pp 1-37
28. Institute of Medicine. National Academy of Sciences (2001) Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. National Academy Press, Washington, DC, USA
29. Berr F, Kern F (1984) Plasma clearance of chylomicrons labeled with retinyl palmitate in healthy human subjects. *J Lipid Res* 25:805-812
30. Roodenburg AJC, Leenen R, Van het hof KH, Weststrate JA, Tijburg LBM (2000) Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of α -carotene, β -carotene and vitamin E in humans. *Am J Clin Nutr* 71(5):1187-1193
31. Hosomi A, Arita M, Sato Y, Kiyose C, Ueda T, Igarashi O, Arai H, Inoue K (1997) Affinity for α -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett* 409:105-108
32. Cohn W (1997) Bioavailability of vitamin E. *Eur J Clin Nutr* 51(Suppl 1):S80-S85
33. Institute of Medicine. National Academy of Sciences (2000) Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. National Academy Press, Washington DC, USA
34. Stahl W, Van den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, Gärtner C, Haenen G, Hollman P, Holst B, Kelly FJ, Polidori MC, Rice-Evans C, Southon S, Van Vliet T, Viña-Ribes J, Williamson G, Astley SB (2002) Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med* 23(1):39-100 (Pergamon)